

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Petra Dvořáková

Vývoj a použití polymerního protilátkového mimetika pro
specifické cílení fibroblastového aktivačního proteinu

Development and use of a polymer-based antibody mimetic for
specific targeting of fibroblast activation protein

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2018

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30. 4. 2018

Petra Dvořáková

Poděkování

V prvé řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Janu Konvalinkovi za vedení diplomové práce, za to, že mě přijal do svého týmu a umožnil mi strávit čtyři roky v jeho laboratoři a podílet se nejen na skvělých projektech, ale také na skvělých společných týmových výjezdech, oslavách a jiných akcích. Děkuji mu za to, že měl vždy otevřené dveře a připravená potřebná slova podpory, pochopení a naděje. Děkuji mu, že ve mě věřil a dával mi vědomí, že věci můžou mít smysl i tam, kde se někdy složitě hledá.

Následující poděkování patří Tomovi Knedlíkovi za to, že se mě tehdy dávno v létě ujal, vzal si mě na starost, a tak díky němu začátky nováčka v laboratoři byly nejen moc fajn, ale také zábavné, a tak nějak už od počátku přátelské. Myslím, že jsme za tu dobu vytvořili dobrou týmovou dvojici. Děkuji mu, že mi se vším pomáhal, že mi svým optimistickým pohledem na věc často ukázal, že je to vlastně v pořádku a nic není tak zlé, jak se zdá.

Děkuji Pavlu Šáchovi, že mi vždy se vším ochotně poradil, zodpověděl všechny mé dotazy a kdykoliv byl připraven pomoci. Děkuji Moni Sivé za podporu a nespočet pěkných a zábavných zážitků. Nikdy by mě nenapadlo, že se ze dvou kolegyň, které občas sdílejí stejnou laboratoř a pracují na úplně jiných projektech, nakonec stanou spolubydlící a tak blízké kamarádky. Děkuji Janči Beranové, která tu byla vždy pro mě, vyslechla mě, nikdy nezmenšovala moje obavy a strachy a hledala řešení, jak se jim postavit. Děkuji Baru Vorlové za velkou podporu, rady a motivaci, že všechno půjde a všechno bude. Děkuji Míšovi Svobodovi za jeho každodenní vtípky, kterými mě bavil, a za všechny momenty, kdy poznal, že je pravý čas na to rozesmát mě. Děkuji Vaškovi Navrátilovi za všechny naše rozhovory o životě a budoucnosti a za inspiraci v jiném pohledu na věci. Děkuji Jitě Zemanové za zábavné chvíle při společném pipetování a podporu. Děkuji Jardovi Kurfürstovi a Janči, že jsem s nimi mohla trávit chvíle po práci hraním a zpíváním. Děkuji Bětce Baudyšové za společné zábavné obědy. Děkuji Karolíně Šrámkové a Ivě Flaisigové za pomoc s čímkoliv, co bylo během experimentů potřeba, Bimči Starkové za pomoc s buňkami a vždy skvělou domluvu, a všem pak za každodenní chod laboratoře nejen po stránce pracovní a materiální.

Chtěla bych poděkovat všem kolegům, protože ty čtyři roky nebyli jen mými kolegy, ale našla jsem v nich hlavně přátele, z nichž některé si budu chtít udržet navždy. Ti všichni mi ukázali, že laboratoř není jen o vědě a o projektech, ale že je i o přátelství, vzájemné podpoře a pomoci.

V neposlední řadě děkuji rodině, která se mnou byla po celou dobu studia a vždy mi dávala pocit a vědomí toho, že ať věci dopadnou jakkoliv, budou při mně vždy stát a podporovat mě.

Abstrakt

Fibroblastový aktivační protein (FAP) je serinová proteasa studovaná v souvislosti především s nádorovými onemocněními, ale poměrně nově také s dalšími chorobami, jako je například revmatoidní artritida nebo cirhóza jater. Zvýšená exprese FAP byla zaznamenána ve více než 90 % epiteliálních nádorů, zatímco ve zdravé tkáni je jeho exprese minimální. Z tohoto důvodu se FAP řadí mezi potenciální cíle protinádorové léčby, a pro jeho roli v dalších onemocněních také mezi možné diagnostické markery. Za účelem inhibice FAP byla vyvinuta série inhibitorů, jejichž důležitou vlastností je jejich selektivita vůči dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV), homologu FAP, která je exprimována ve většině zdravých tkání. Tato diplomová práce představuje nový nástroj pro studium FAP – polymerní konjugát obsahující inhibitor FAP jako cílcí ligand, dále pak fluorofor pro vizualizaci konjugátu a biotin pro jeho imobilizaci. Polymerní konjugát jako tzv. protilátkové mimetikum umožňuje široké využití v *in vitro* metodách pro detekci, vizualizaci a specifické cílení FAP. V práci je ukázáno, že polymerní konjugát selektivně a účinně inhibuje FAP, s více než třířádivým rozdílem inhibiční konstanty ve srovnání s DPP-IV. Zároveň byl tento konjugát otestován v několika *in vitro* metodách. S pomocí anti-FAP konjugátu byl FAP úspěšně izolován ze směsi proteinů buněčného lyzátu, detekován v metodách ELISA a Western blot. Možnost použití anti-FAP konjugátu pro vizualizaci FAP na živých buňkách byla potvrzena konfokální mikroskopií a následně průtokovou cytometrií. Cytotoxická verze konjugátu byla navíc použita pro selektivní ničení buněk exprimujících FAP, kdy prvotní experimenty ukázaly existenci poměrně širokého terapeutického okna. Tyto výsledky ukazují, že polymerní konjugát má využití v *in vitro* metodách, a je také slibným nástrojem pro následné *in vivo* experimenty zaměřené na terapii či diagnostiku.

Klíčová slova: fibroblastový aktivační protein, proteasy, dipeptidylpeptidasa IV, protilátková mimetika, HPMa kopolymery, polymerní konjugáty, nádorová terapie, směřování léčiv

Abstract

Fibroblast activation protein (FAP) is a serine protease which is associated with cancer and recently also with other diseases such as rheumatoid arthritis or liver cirrhosis. Increased expression of FAP was observed in more than 90 % of epithelial cancers in contrast to its minimal expression levels in healthy tissues. FAP therefore represents a potential target for anti-cancer treatment as well as a diagnostic marker for various other diseases. In order to accomplish inhibition of FAP, a series of inhibitors was developed. The essential property of the inhibitors is their selectivity against dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), a homologue of FAP, which is expressed in majority of healthy tissues. This diploma thesis describes a novel research tool for characterization of FAP – a polymer conjugate containing FAP inhibitor as a targeting ligand, fluorophore for the visualization of the conjugate and biotin for its immobilization. The polymer conjugate functions as an antibody mimetic, which can be used in a variety of biochemical methods for detection, visualization and specific targeting of FAP. This study shows that the polymer conjugate selectively and effectively inhibits FAP with more than three orders of magnitude difference of the inhibition constant in comparison to DPP-IV. At the same time, the conjugate was tested in various *in vitro* methods. Using the anti FAP conjugate, the FAP protease was successfully isolated from a mixture of proteins in cell lysate and detected in methods ELISA as well as Western blot. To show that the anti-FAP conjugate can be used for visualisation of FAP on living cells, confocal microscopy and flow cytometry were performed. Furthermore, the cytotoxic version of the conjugate was used to selectively kill cells expressing FAP. The initial experiments indicate a major therapeutic potential of the conjugates. The results show that the polymer conjugate is not only usable in *in vitro* methods but also represents a promising tool for *in vivo* experiments in therapy and diagnostics.

Key words: fibroblast activation protein, proteases, dipeptidyl peptidase IV, antibody mimetics, HPMA copolymers, polymer conjugates, cancer therapy, drug delivery

Seznam zkratek

APCE	enzym štěpící α_2 -antiplasmin
CT	výpočetní tomografie
DARPin	z angl. designed ankyrin protein repeats
DOTA	tetraazacyklododekantetraoctová kyselina
DPP-IV	dipeptidylpeptidasa IV
EPR	efekt zvýšené permeability a retence
FAK	fokální adhezivní kinasa
FAP	fibroblastový aktivační protein
FBS	fetální bovinní sérum
FGF21	fibroblastový růstový faktor 21
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)metakrylamid
IL2v	varianta interleukinu 2
NPY	neuropeptid Y
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PET	pozitronová emisní tomografie
SDS	dodecylsulfát sodný
SF	Strep-tag, Flag-tag
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
uPAR	urokinasový aktivátor plasminogenu
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Fibroblastový aktivační protein.....	2
2.1.1	Struktura FAP.....	2
2.1.2	Enzymová aktivita a substráty FAP.....	3
2.1.3	Exprese FAP a jeho klinický význam.....	5
2.1.3.1	<i>FAP v nádorových onemocněních.....</i>	5
2.1.3.2	<i>Neenzymová funkce FAP v nádorech.....</i>	7
2.1.3.3	<i>FAP v jiných onemocněních.....</i>	7
2.2	Dipeptidylpeptidasa IV – blízký homolog FAP.....	9
2.3	Cílicí molekuly pro FAP v terapii.....	10
2.3.1	Protilátky proti FAP a jejich deriváty.....	11
2.3.2	Inhibitory FAP.....	12
2.3.3	Molekuly pro zobrazování FAP v diagnostice.....	14
2.4	Náhrady protilátek v biomedicině.....	16
2.4.1	Polymerní konjugáty jako protilátková mimetika.....	17
2.4.2	Cílené doručování léčiv pomocí polymerních konjugátů.....	18
3	Cíle práce.....	20
4	Materiály a metody.....	21
4.1	Materiály, chemikálie, roztoky.....	21
4.2	Příprava plasmidů pro expresi FAP a DPP-IV.....	23
4.2.1	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR).....</i>	24
4.2.2	<i>Restrikční štěpení, ligace a transformace kompetentních bakterií.....</i>	26
4.2.3	<i>Minipreparace plasmidové DNA.....</i>	27
4.3	Příprava stabilních transfektantů.....	27
4.4	Exprese rekombinantních proteinů FAP a DPP-IV.....	27
4.4.1	Purifikace Avi-DPP-IV přes Avi-tag.....	28
4.4.2	Purifikace SF-FAP přes Strep-tag.....	29
4.5	Měření inhibice enzymové aktivity FAP a DPP-IV.....	30
4.6	Stanovení K_D pomocí povrchové plasmonové rezonance (SPR).....	31
4.7	Afinitní izolace („imunoprecipitace“) FAP z buněčného lyzátu.....	32
4.8	Konfokální mikroskopie buněk exprimujících FAP.....	32
4.9	Analýza buněk exprimujících FAP pomocí průtokové cytometrie.....	33

4.10	ELISA pro kvantitativní detekci FAP	34
4.11	Western blot pro detekci FAP	34
4.12	Selektivní zabíjení buněk pomocí cytotoxického anti-FAP konjugátu	35
5	Výsledky	36
5.1	Klonování, exprese a purifikace rekombinantních proteinů FAP a DPP-IV	36
5.2	Výběr inhibitoru FAP a charakterizace vazby anti-FAP konjugátu	39
5.2.1	Stanovení inhibičních schopností připravených inhibitorů FAP	39
5.2.2	Stanovení disociační konstanty K_D anti-FAP konjugátu pomocí SPR	41
5.3	Použití anti-FAP konjugátu pro detekci a izolaci FAP <i>in vitro</i>	42
5.3.1	Použití anti-FAP konjugátu pro detekci FAP v metodě ELISA	42
5.3.2	Použití anti-FAP konjugátu pro afinitní izolaci FAP z buněčného lyzátu	43
5.3.3	Použití anti-FAP konjugátu pro detekci FAP pomocí Western blotu	44
5.4	Použití anti-FAP konjugátu pro detekci FAP v buněčných experimentech	45
5.4.1	Vizualizace FAP na buňkách pomocí konfokální mikroskopie	45
5.4.2	Detekce FAP na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie	47
5.5	Selektivní zabíjení buněk pomocí cytotoxického anti-FAP konjugátu	47
6	Diskuse	50
7	Závěr	57
8	Použitá literatura	58

1 Úvod

Proteasy jsou enzymy, které jsou kvůli své proteolytické aktivitě přispívající k rozvoji nádorů častými cíli protinádorové léčby. Mezi proteasy tohoto charakteru se řadí i fibroblastový aktivační protein (FAP).

FAP je transmembránová serinová proteasa, která byla objevena na základě své exprese ve stromálních fibroblastech epiteliálních nádorů. Později bylo ukázáno, že jeho exprese není omezena jen na stroma nádoru, ale také na vlastní nádorové buňky. Přibývá i publikací, které popisují možnou roli FAP také v dalších onemocněních – fibróze, cirhóze, ateroskleróze či revmatoidní artritidě. S ohledem na expresi FAP je důležité to, že ve zdravém těle je jeho přítomnost omezená jen na velmi úzký okruh tkání. Další zajímavou vlastností FAP je jeho endopeptidasová aktivita, která mu umožňuje štěpit substráty jako je například kolagen, tedy složku mezibuněčné hmoty. Pro tuto aktivitu, související s možným napomáháním invazivitě a růstu nádoru, se stal FAP cílem pro vývoj inhibitorů a jiných nástrojů, zamezujících jeho aktivitě nebo využívajících FAP jako prostředek pro doručování cytotoxických látek do nádorů. Přitom je důležité, aby tyto nástroje specificky cílily pouze na FAP a ne jeho blízký homolog dipeptidylpeptidasu IV (DPP-IV), se kterou FAP sdílí 52% sekvenční identitu. Na rozdíl od FAP má DPP-IV již známé fyziologické role v těle a je přítomná v mnoha zdravých tkáních. Proto je pro minimalizování vedlejších účinků způsobených nežádoucím cílením DPP-IV důležitá selektivita inhibitorů FAP.

V posledních letech bylo navrženo několik potenciálních náhrad protilátek, které mohou být jejich levnější, stabilnější a jednodušeji modifikovatelnou variantou. Pro tyto náhrady protilátek se v literatuře používá pojem protilátková mimetika. V této diplomové práci je představen nový nástroj pro studium FAP, využitelný jako protilátkové mimetikum v mnoha *in vitro* metodách. Tento nástroj je založen na biokompatibilním a ve vodě rozpustném kopolymeru *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA), na který jsou připojeny tři funkční ligandy – inhibitor FAP, fluorofor a biotin – umožňující jak specifické cílení FAP, tak jeho detekci a vizualizaci. Protože HPMA kopolymery mají svou dlouhou historii v protinádorové terapii, připojením inhibitoru FAP společně s cytotoxickou molekulou k HPMA řetězci vznikl také nástroj pro potenciální cílené doručování léčiv do nádorů exprimujících FAP.

2 Literární přehled

2.1 Fibroblastový aktivační protein

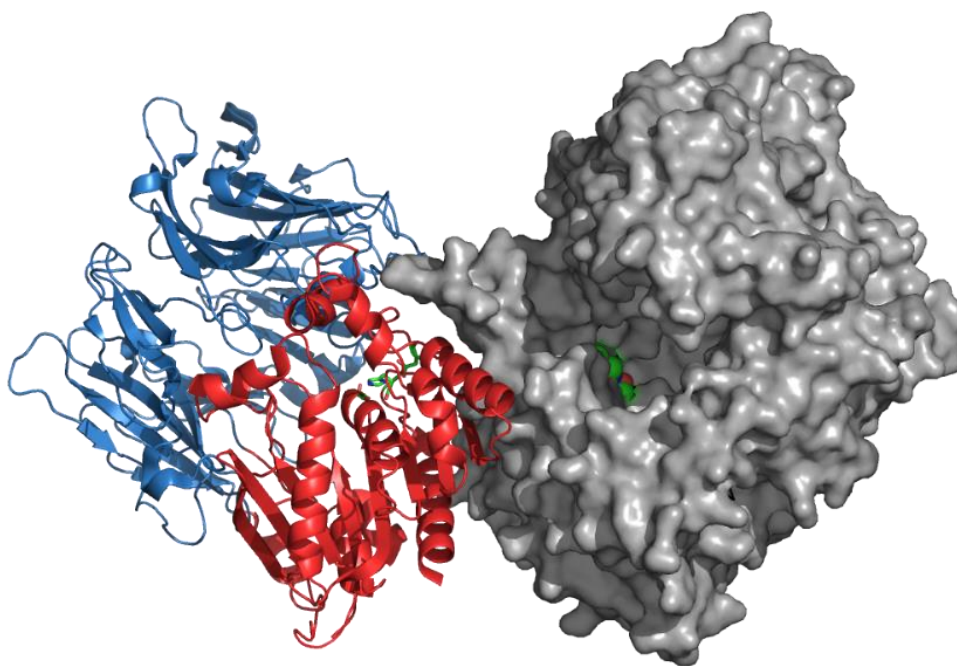
Proteasy mají svou nezastupitelnou roli v mnoha procesech odehrávajících se ve zdravém těle. Zároveň se však svou proteolytickou aktivitou podílí na celé řadě patologických jevů, z nichž nejvýznamnější je jejich role v progresi nádorů, kdy svou činností přispívají k migraci nádorových buněk a k novotvorbě cév vyživujících nádor (shrnuť v López-Otín and Bond, 2008; Sevenich and Joyce, 2014).

Fibroblastový aktivační protein (FAP) je serinová proteasa, která je intenzivně studována v souvislosti s některými onemocněními – především s nádorovými (Garin-Chesa et al., 1990), ale v posledních letech také s revmatoidní artritidou (Bauer et al., 2006), jaterní cirhózou (Levy et al., 1999) nebo fibrózou (Acharya et al., 2006). Již od objevu FAP na konci 80. let minulého století se předpokládalo, že se tento protein stane zajímavým předmětem zkoumání na další desetiletí.

2.1.1 Struktura FAP

FAP je transmembránový protein, jehož struktura je tvořena krátkou N-terminální cytoplasmatickou částí (6 aminokyselin), transmembránovou částí (20 aminokyselin) a rozsáhlou extracelulární C-terminální částí (734 aminokyselin) (Goldstein et al., 1997). Spojením dvou monomerních 97 kDa jednotek vzniká enzymově aktivní dimerní forma enzymu (Piñeiro-Sánchez et al., 1997) (Obr. 1).

V krevní plasmě byla nalezena také rozpustná forma enzymu postrádající cytoplasmatickou a transmembránovou část, pojmenovaná jako enzym štěpící α_2 -antiplasmin (APCE; z angl. antiplasmin-cleaving enzyme) (Lee et al., 2006) – inhibitor plasminu, který štěpí fibrin (Wiman and Collen, 1979). Původ ani vznik této formy není znám, o možné funkci se také spekuluje ve spojení s poměrně nedávno nalezenými substráty (Keane et al., 2011) (viz kapitola Enzymová aktivita a substráty FAP). Kromě tedy popsané schopnosti štěpit α_2 -antiplasmin, kdy by mohl FAP (APCE) přispívat k průběhu fibrinolýzy (Lee et al., 2004, 2006), zůstává ještě otevřenou otázkou role FAP ve fyziologických či patologických procesech zahrnujících objevené substráty hormonálního či neurotransmiterového charakteru (Keane et al., 2011).

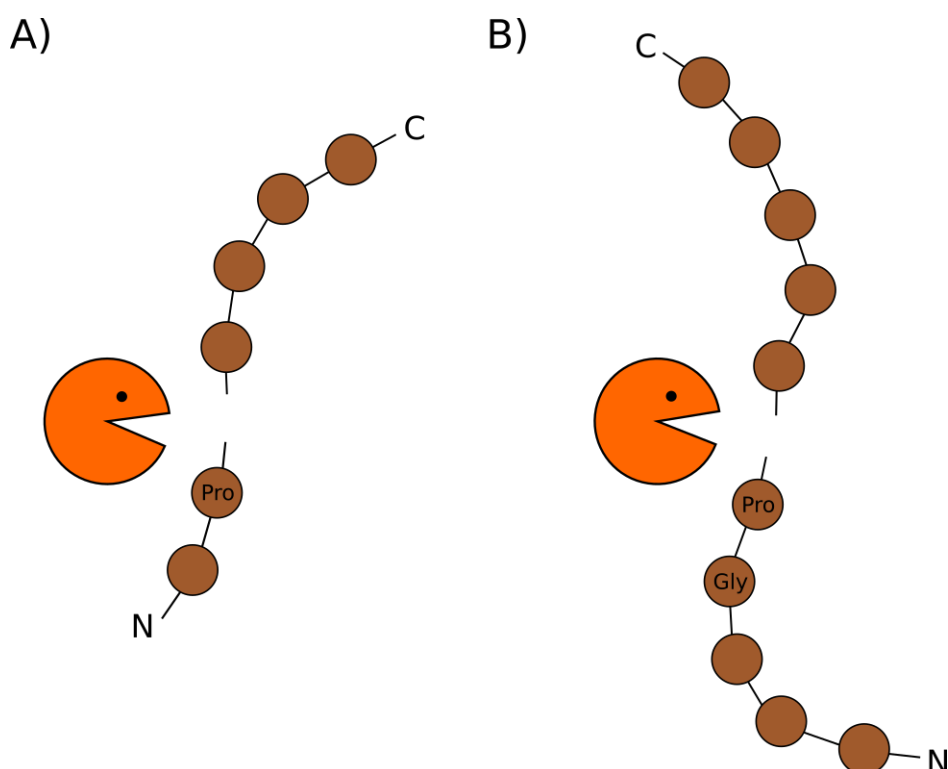


Obr. 1: Struktura FAP vytvořená v softwaru PyMOL (pdb kód 1Z68). Rozdílným zobrazením jsou viditelné dva monomery tvořící dimerní protein. V rámci monomeru jsou odlišeny dvě domény, kdy jedna z nich je tvořena především beta listy (modře) a druhá pak z velké části alfa helixy (červeně). V monomeru zobrazujícím povrch enzymu lze vidět dutinu vedoucí do aktivního místa tvořeného katalytickou triádou Ser624, His734, Asp702 (Aertgeerts et al., 2005).

2.1.2 Enzymová aktivita a substráty FAP

Na základě schopnosti odštěpovat dipeptidy z N-konce proteinů byl FAP zařazen mezi aminodipeptidasy (tzv. S9B oligopeptidasová rodina) (Edosada et al., 2006a; Park et al., 1999). To, co však FAP činí zajímavým a odlišuje ho od ostatních zástupců široké skupiny aminodipeptidas, je schopnost štěpit peptidy či proteiny nejen od volného konce, ale také uvnitř sekvence (Obr. 2). Touto svou aktivitou se FAP řadí také mezi endopeptidasy, což bylo objeveno na nativním kolagenu typu I, proteinu bohatém na prolin (Park et al., 1999), kdy je pro tuto aktivitu vyžadována sekvence glycín (v pozici P2) a prolin (v pozici P1) (Edosada et al., 2006b; Jambunathan et al., 2012). Protože kolagen je součástí extracelulární matrix, začalo se uvažovat o souvislosti endopeptidasové aktivity FAP s vývojem některých onemocnění, zvláště pak s nádorovými. V nádorových onemocněních je největším úskalím vytváření metastáz,

tedy sekundárních ložisek nádoru, k jejichž tvorbě přispívá rozvolňování mezibuněčné hmoty a usnadněná migrace nádorových buněk do vzdálenějších míst od primárního místa vzniku (shrnutí v Guan, 2015). Po prokázání kolagenasové aktivity FAP *in vitro* (Park et al., 1999) byla poté *in vivo* v myším modelu s delecí genu pro FAP pozorována akumulace kolagenu (Santos et al., 2009). Souvislost endopeptidasové aktivity FAP s degradací extracelulární matrix vedla k vývoji inhibitorů cílících aktivní místo FAP (více v kapitole 2.3).



Obr. 2: Enzymová aktivita FAP. FAP patří mezi aminodipeptidasy, kdy z N-konce peptidů odštěpuje dipeptidy za prolinovým zbytkem (A). Zajímavější a důležitější pro jeho roli v onemocněních je jeho endopeptidasová aktivita, díky které dokáže štěpit substráty s prolinem také uvnitř peptidové sekvence (B).

Později byly objeveny nové substráty dipeptidylpeptidasové aktivity FAP, které mají většinou hormonální povahu – natriuretický peptid B (BNP), substance P (SP), peptid YY (PYY), s výjimkou neuropeptidu Y (NPY), což je neurotransmitter (Keane et al., 2011). Protože schopnost FAP štěpit tyto substráty byla testována na vzorcích plasmy, předpokládá se, že by se mohlo jednat o endogenní substráty FAP, což otevírá celou novou kapitolu o možné fyziologické funkci FAP a také o jeho vztahu k onemocněním.

Pro lidský i myší FAP se jevil jako nejvíce účinný substrát NPY, kdy autoři publikace vznesli hypotézu o možné souvislosti regulace NPY, FAP a jaterní cirhózy. Hypotézu podpořily také výsledky imunohistochemie lidské jaterní cirhotické tkáně, kdy byla pozorována lokalizace NPY a jeho receptoru na rozhraní parenchymálních a stromálních buněk, přičemž právě na mesenchymálních buňkách stromatu je FAP exprimován. NPY by tak mohl díky své lokalizaci být vystaven blízkosti FAP (Wong et al., 2016).

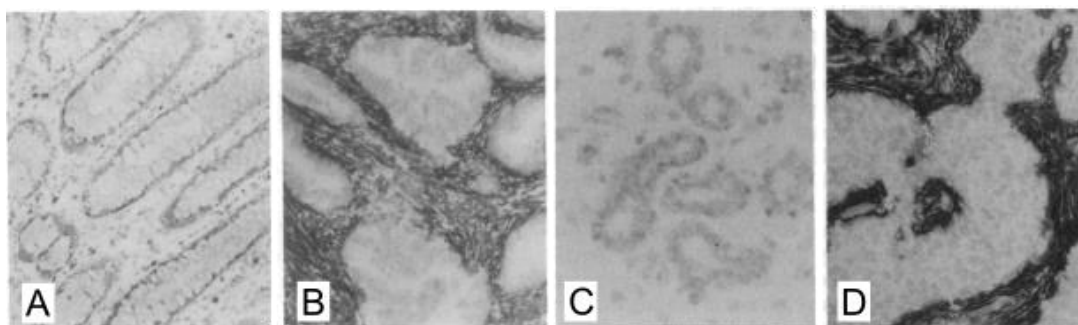
Následně byl pak nedávno popsán v samostatné studii další zajímavý substrát, a to fibroblastový růstový faktor 21 (FGF21; z angl. fibroblast growth factor 21), jehož role je důležitá v regulaci metabolismu (Moyers et al., 2007). Bylo prokázáno, že FGF21 je enzymovou aktivitou FAP inaktivován (Dunshee et al., 2016; Zhen et al., 2016). Pokusy na myších modelech také ukázaly, že podáváním inhibitoru FAP (talabostat, PT-100) došlo u obézních myší („DIO mice“ – diet induced obesity mice) k úbytku tělesné váhy, ke snížení hladiny glukosy v krvi, plazmatického insulinu a cholesterolu. U štíhlých myší byly tyto efekty mnohem více potlačené. Množství FGF21 v krevní plasmě bylo pak u obézních myší zvýšeno, na rozdíl od myší štíhlých. Na základě těchto výsledků se tak uvažuje o FAP jako o novém metabolickém cíli pro léčbu obezity či také cukrovky (Sánchez-Garrido et al., 2016).

2.1.3 Exprese FAP a jeho klinický význam

2.1.3.1 FAP v nádorových onemocněních

Důvodem, proč je FAP slibným potenciálním cílem pro diagnostiku a protinádorovou terapii, je jeho tkáňová exprese. Zatímco ve zdravých dospělých tkáních je FAP exprimován velmi zřídka, např. na pankreatických alfa buňkách (Busek et al., 2015), v děložní sliznici v proliferační fázi (Dolznig et al., 2005) či mezenchymálních buňkách kostní dřeně (Bae et al., 2008), je vysoce exprimován na stromálních fibroblastech více než 90 % nádorů epiteliálního původu – v kolorektálním karcinomu, karcinomu prsu, vaječníků, plic (Garin-Chesa et al., 1990, Obr. 3). Jeho zvýšená exprese byla zaznamenána také ve stromatu glioblastomu (Busek et al., 2016) a mnohočetného myelomu (Ge et al., 2006). Později se ukázalo, že je FAP přítomný nejen na buňkách obklopujících nádor, ale i na vlastních buňkách nádorových – takto byl popsán jeho výskyt v karcinomu kolorekta (Iwasa et al., 2003), děložního čípku (Jin et al., 2003),

pankreatu (Shi et al., 2012), prsu (Kelly et al., 1998), dlaždicového epitelu ústní dutiny (Wang et al., 2014) také v nádorových buňkách glioblastomu (Busek et al., 2016).



Obr. 3: Analýza exprese FAP pomocí monoklonální protilátky proti FAP na histologických řezech z jednotlivých orgánů. A) Zdravá sliznice tlustého střeva – bez exprese FAP. B) Adenokarcinom tlustého střeva s výraznou expresí FAP ve stromatu. C) Zdravá prsní tkáň – bez exprese FAP. D) Karcinom prsu s výraznou expresí FAP ve stromatu. Převzato z (Garin-Chesa et al., 1990).

Právě pro tento rozdílný expresní profil zdravé versus patologické tkáně je FAP intenzivně studován se záměrem využít ho jako prostředek k léčbě nádorových onemocnění. To dokládá i počet klinických studií, ve kterých FAP figuruje, a jejichž počet v posledních letech narůstá. Zdroj clinicaltrials.gov uvádí čtyři v minulosti ukončené klinické studie, dvě započaté v prvním čtvrtletí tohoto roku, další dvě započaté v roce 2015 s plánovaným ukončením letos nebo příští rok (www.clinicaltrials.gov). I to je důkazem, že FAP je zajímavý proteinový cíl v oblasti protinádorové léčby, přestože se jeho role v nádorech ukazuje v některých případech jako diskutabilní. Stále převažují publikace, ve kterých byla popsána korelace zvýšené exprese FAP a progresu nádoru, jako například v karcinomu žaludku, kde byla zaznamenána závislost exprese FAP na migraci nádorových buněk a při umlčení jeho exprese došlo k potlačení tohoto jevu (Wang et al., 2013). Vysoká exprese FAP transfekovaného do buněk karcinomu vaječníku vedla ke zvýšené proliferaci a migraci buněk *in vitro* a následně po injekci buněk do myši byl v případě buněk exprimujících FAP pozorován rychlejší růst nádoru (Yang et al., 2013). V myších modelech karcinomu plic a kolorektálního karcinomu s deletovaným genem pro FAP a v myších, kterým byl podáván inhibitor FAP, došlo ke snížení růstu nádoru, k akumulaci kolagenu a k potlačení angiogeneze (Santos et al., 2009). Objevily se ale také studie představující FAP jako nádorový supresor, kdy naopak

při injekci melanomových buněk transfekovaných FAP a jeho inaktivním mutantem, nádory vykazovaly potlačený nebo téměř žádný růst oproti kontrolním nádorům odvozených z buněk netransfekovaných FAP (Ramirez-Montagut et al., 2004).

2.1.3.2 Neenzymová funkce FAP v nádorech

Ačkoliv se většina publikací věnuje tématu FAP a jeho příspěvku k invazivitě nádorových buněk činností enzymovou, byl objeven také neenzymový vliv FAP na vývoj nádorových onemocnění, a to účasti v signální kaskádě vedoucí k progresi nádoru.

Již dříve bylo popsáno, že FAP kolokalizuje s receptorem pro urokinasový aktivátor plasminogenu (uPAR; z angl. urokinase-type plasminogen activator receptor) (Artym et al., 2002). Tento jev byl pak dále studován v souvislosti s imunosupresivitou fibroblastů asociovaných s nádory (CAFs; z angl. cancer associated fibroblasts), na kterých je FAP exprimován, zprostředkovanou STAT3-CCL2 signalizací. Na počátku signální dráhy FAK-Src-JAK2-STAT3 vedoucí k aktivaci STAT3 stojí uPAR, který aktivuje fokální adhezivní kinasu (FAK; z angl. focal adhesion kinase), kdy tato kinasa je důležitým prostředníkem mnoha signálních kaskád podporujících nádorové bujení. Bylo pozorováno, že exprese FAP korelovala se zvýšenou hladinou fosforylace účastníků této dráhy. (Yang et al., 2016).

V případě dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní (oral squamos cell carcinoma) pak umlčená exprese FAP vedla k inaktivaci signální dráhy PTEN-PI3K-AKT a Ras-ERK a k umlčené expresi genů zodpovědných za epiteliálně-mesenchymální transici, což následně vyústilo ve sníženou schopnost invazivity nádorových buněk a jejich proliferace (Wang et al., 2014).

2.1.3.3 FAP v jiných onemocněních

Expres FAP však souvisí nejen s nádory, ale byla zaznamenána i v jiných onemocněních. Na histologických preparátech pacientů diagnostikovaných idiopatickou plicní fibrosou bylo prokázáno, že FAP je exprimován ve fibroblastech tkáně postižené fibrosou, zatímco ve zdravé plicní tkáni nebyl přítomen. (Acharya et al., 2006). Ukazuje se, že FAP by mohl mít v tomto onemocnění nejen funkci markeru, ale také enzymovou aktivitou přispívat ke katabolismu kolagenu. Jeho roli v regulaci extracelulární matrix by měla být věnována pozornost, data z myších modelů totiž ukazují, že v nepřítomnosti FAP dochází k hromadění kolagenu, následně ke zvýšené fibrose a mortalitě myši. Tato

zjištění tak staví FAP do překvapivě možné protektivní role v tomto onemocnění (Fan et al., 2016).

Ve stelárních jaterních buňkách pacientů s cirhousou jater byla detekována mRNA pro FAP a jeho proteinová exprese byla současně potvrzena imonuhistochemicky. Protože ve vzorcích zdravé jaterné tkáně jeho exprese zaznamenána nebyla, uvažuje se také o roli FAP v tomto onemocnění (Levy et al., 1999). Ve vzorcích plasmy pacientů diagnostikovaných cirhousou jater bylo pomocí metody ELISA změřeno, že u osob trpících touto chorobou bylo signifikantně zvýšené množství štěpeného produktu substrátu APCE (rozpuštěné formy FAP), α_2 -antiplasminu, což bylo v souladu i se zvýšeným množstvím APCE v plasmě. Zvýšená množství produktu štěpení navíc korelovala se závažností onemocnění (Willige et al., 2013).

V dalším onemocnění, ve kterém by mohl FAP figurovat, je revmatoidní artritida a osteoartritida. Na histologických preparátech byla pomocí imunohistochemie zjištěna exprese FAP na fibroblastoidních synoviálních buňkách, pocházejících z vnitřní části kloubů, přičemž barvení v případě revmatoidní artritidy bylo mnohem intenzivnější než v případě osteoartritidy. Autoři na základě těchto výsledků uvádí FAP jako možný marker synoviálních buněk artritidy a jako cíl inhibice jeho aktivity pro zabránění potenciální degradace extracelulární matrix (Bauer et al., 2006).

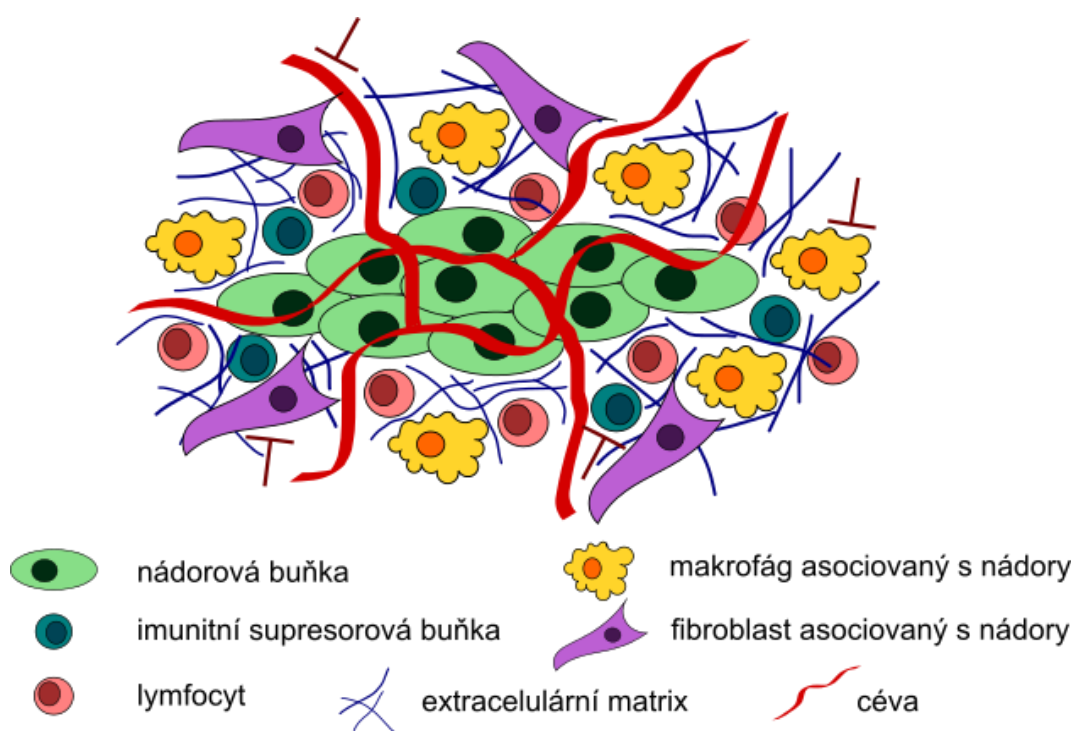
FAP je studován také v souvislosti s hojením srdeční tkáně v ischemických onemocněních, kdy byla jeho zvýšená exprese zaznamenána na aktivovaných myofibroblastech v místech poraněné tkáně po indukci infarktu myokardu v potkaních modelech. Stejně tak byla exprese potvrzena i na vzorcích lidské srdeční tkáně pacientů po akutním infarktu a metodou želatinové zymografie byla také pozorována degradace želatiny aktivitou těchto fibroblastů pozitivních na FAP. Objasnění role FAP v ischemických chorobách si sice žádá hlubší studii, zdá se však, že by FAP mohl sloužit jako diagnostický marker aktivovaných fibroblastů v srdeční ischemii (Tillmanns et al., 2015). Další z patologií, ve které byla přítomnost FAP prokázána, je ateroskleróza. Zvýšená exprese FAP byla zaznamenána v aterosklerotických plátech, zatímco ve zdravé aortě bez aterosklerotických plátů FAP exprimován nebyl. Vysoká exprese FAP v tenkých plátech (v tzv. „thin fibrous caps“) korelovala s nízkým obsahem kolagenu. Použitím protilátky proti katalytické doméně FAP došlo ke snížení množství štěpeného kolagenu v místech exprese FAP. Výsledky naznačují, že FAP by mohl představovat diagnostický či terapeutický cíl pro pacienty s aterosklerózou a s rizikem akutního koronárního syndromu (Brokopp et al., 2011).

2.2 Dipeptidylpeptidasa IV – blízký homolog FAP

V případě protinádorové terapie s využitím FAP jako cíle je zásadní jeho homologie s enzymem dipeptidylpeptidasou IV (DPP-IV) (Piñeiro-Sánchez et al., 1997). Jedná se o membránový homodimer, velmi podobné strukturní stavby jako je FAP: největší část tvoří C-terminální extracelulární doména (aminokyseliny 29-766), následuje transmembránová část (aminokyseliny 7-28), jež přechází v krátkou cytoplazmatickou část (aminokyseliny 1-6). Také DPP-IV existuje v rozpustné formě postrádající transmembránovou část (Chung et al., 2010; Engel et al., 2003). Tato serinová proteasa se svou aktivitou řadí také do oligopeptidasové rodiny S9B, v jejímž rámci jsou si s FAP nejbližšími homology s 52% sekvenční podobností (Piñeiro-Sánchez et al., 1997). To, v čem se však tyto dva enzymy liší, je jejich exprese a enzymová aktivita. Zatímco exprese FAP je velmi specifická (Garin-Chesa et al., 1990), DPP-IV je exprimována v mnoha tkáních a orgánech, jako jsou ledviny, slinivka, játra, prostata, plíce, gastrointestinální trakt, děloha a další (Dinjens et al., 1989) a v lidském těle také plní nejrůznější funkce (shrnutí v Gorrell et al., 2001). Mezi její hlavní role patří štěpení substrátů zahrnutých v metabolismu glukosy – degraduje inkretiny glukagonu podobný peptid (GLP-1; z angl. glucagon-like peptide-1) a insulinotropní peptid závislý na glukose (GIP; glucose-dependent insulinotropic peptide), které jsou po příjmu potravy zodpovědné za stimulaci sekrece insulinu a snížení sekrece glukagonu (Marguet et al., 2000). Inhibitory DPP-IV se tak staly používaným lékem při cukrovce druhého typu (shrnutí v Irons et al., 2012). Další z jejích fyziologických funkcí spadá do imunitního systému, kdy aktivuje T lymfocyty a je tak více známá pod jménem CD26 (shrnutí v Ohnuma et al., 2008). Ani DPP-IV však není výjimkou v účasti na vývoji některých nádorových onemocnění. Mnoho studií popisuje její nádorově supresorovou funkci potlačující růst nádorů, jako bylo prokázáno na myších modelech karcinomu vaječníku (Kajiyama et al., 2002) nebo v případě karcinomu prostaty, a to degradací faktoru stromálních buněk (SDF-1; z angl. stromal cell-derived factor 1), objevily se ale i publikace popisující DPP-IV jako aktivátora progresu nádorového bujení, například v maligním mesoteliomu (Okamoto et al., 2014). Právě proto, že je DPP-IV na rozdíl od FAP všudypřítomná a má zastoupení ve fyziologických procesech v těle, je klíčové při vývoji látek cílících na její homolog FAP dbát na jejich selektivitu, aby nedocházelo k inhibici DPP-IV a k nežádoucím vedlejším efektům léčby.

2.3 Cílicí molekuly pro FAP v terapii

Protinádorová terapie se v posledních letech nezaměřuje jen na cílení na vlastní nádorové buňky, ale také na nádorové mikroprostředí neboli tzv. nádorové stroma (případně na kombinaci obou přístupů), tvořené buňkami a strukturami podporujícími růst nádoru a jeho invazivitu. Mezi stroma (Obr. 4) se řadí fibroblasty, buňky imunitního systému, krevní cévy a extracelulární matrix. Právě jejich příspěvek k vývoji nádorových onemocnění se považuje za jeden z možných důvodů, proč selhávají klasické léčebné postupy (např. chemoterapie). Ty jsou převážně zaměřené na vlastní nádorové proliferující buňky, což nedovoluje v mnoha případech kompletní odstranění nádoru (shrnuje v Chen et al., 2015)



Obr. 4: Nádorové mikroprostředí představující souhrn buněk a struktur obklopujících vlastní nádorové buňky a podporující růst a vývoj nádoru. Jedná se hlavně o buňky imunitního systému, nádorové fibroblasty a krevní cévy. Schematický obrázek znázorňuje možné cesty cílení nádorové stroma s terapeutickým potenciálem. Tvorba obrázku byla inspirována (Siegler et al., 2016).

Pro tyto účely se stal FAP, jako marker stromálních fibroblastů (Garin-Chesa et al., 1990) (nebo tzv. fibroblastů asociovaných s nádory) ideálním kandidátem na cíl protinádorové léčby, a to ze dvou úhlů pohledu. V menší míře FAP představuje cíl pro malé molekuly vážící aktivní místo FAP, a tím zamezující jeho enzymové aktivitě (viz.

studie o korelující expresi FAP s invazivitou nádorových buněk (Wang et al., 2013)). V hlavní míře je však FAP využíván jako směrovací adresa a prostředník pro doručování cytotoxických látek do nádoru.

2.3.1 Protilátky proti FAP a jejich deriváty

Jako první z molekul proti FAP se do popředí zájmu dostala humanizovaná forma monoklonální protilátky s názvem sibrotuzumab. Přestože její použití vypadalo nadejně, skončila v roce 2003 v průběhu fáze II klinického testování. Na kohortě pacientů s pokročilým nádorem a metastázemi kolorektálního karcinomu nebyl pozorován účinek vedoucí ani k mírnému pozitivnímu výsledku, tedy k ústupu nádoru (Hofheinz et al., 2003).

I přes tento neúspěch další skupina vytvořila konjugát této protilátky s cytotoxickým inhibitorem tubulinu maytansinoidem DM1, který při testování na xenograftech lidských nádorů v myších uspěl ve třech případech ze čtyř. Protože literatura ani databáze klinických studií (zřejmě po neúspěchu samotné protilátky) nepodává žádnou navazující publikaci nebo studii s použitím tohoto konjugátu, jednalo se spíše o potvrzení konceptu, že protilátka po vazbě na FAP internalizuje a že lze tímto způsobem cílit na nádory exprimující FAP (Ostermann et al., 2008).

V nedávno publikované studii využívali FAP v tzv. 3D heterotypickém sféroidním modelu nádorového prostředí jako marker stromálních fibroblastů, kdy připravili monomerní variantu interleukinu 2 (IL2v; z angl. interleukin 2 variant) zfúzovaného s anti-FAP protilátkou (IgG-IL2v). Tento konjugát na jedné straně vázal FAP a na druhé straně pomocí IL2v aktivoval CD8⁺ efektorové a CD4⁺ pomocné T buňky a NK buňky. Při použití v kombinaci s bispecifickou protilátkou (FAP-TCB), která váže FAP a současně CD3ε (epsilon řetězec CD3) antigen na T buňkách, došlo k účinné eliminaci fibroblastů pozitivních na FAP (Herter et al., 2017). IL2v cílí FAP je v kombinaci s trastuzumabem (toxický konjugát protilátky pro léčbu karcinomu prsu) nebo cetuximabem (pro léčbu karcinomu hlavy a krku) součástí probíhající fáze I klinické studie pro pacienty s pokročilým nádorem nebo s metastázemi (ClinicalTrials.gov, identifikátor studie: NCT02627274). Stejně tak je tento imunokonjugát testován ve fázi I probíhající klinické studie s pacienty s rozvinutým metastatickým karcinomem ledviny v kombinaci s atezolizumabem proti receptoru PD-1 (z angl. programmed cell death protein 1) a bevacizumabem proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru A

(VEGF-A) (ClinicalTrials.gov; identifikátor studie: NCT03063762). Tyto studie dokládají, že FAP je pro svou expresi a lokalizaci v nádorech stále obsáhlým, zajímavým tématem a i přes počáteční neúspěch terapie s použitím protilátky konjugované k cytotoxické látce se díky novým přístupům otevírá mnoho možností na poli imunoterapie.

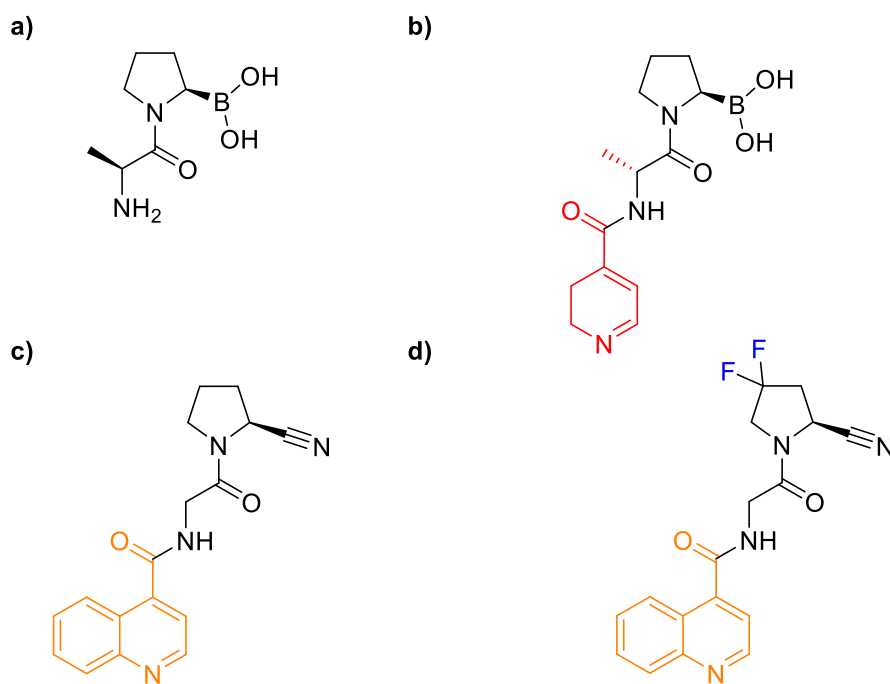
2.3.2 Inhibitory FAP

Kromě protilátek se vývoj cílicích terapeutik zaměřuje také na malé molekuly. Pro vývoj inhibitorů aktivního místa enzymu bylo využito známé enzymové aktivity FAP a jeho aminokyselinové preference při štěpení substrátů. Dále se využívá skutečnosti, že FAP je serinová proteasa (Aertgeerts et al., 2005), proto velká část inhibitorů obsahuje skupiny reagující právě s katalytickým serinem.

Při vývoji selektivních inhibitorů FAP (tj. necílicích DPP-IV) se vychází z rozdílné aktivity obou enzymů. FAP totiž vykazuje specifickou endopeptidasovou aktivitu (Park et al., 1999), zatímco DPP-IV odštěpuje dipeptidy pouze z volného N-konce peptidů, nikoliv uvnitř sekvence. DPP-IV vykazuje tedy pouze exopeptidasovou aktivitu, která je dokonce účinnější než u FAP. Důvodem je kyselý zbytek Asp663 snadněji interagující s volným NH_3^+ koncem peptidů; FAP má na odpovídající pozici Ala657. Protože DPP-IV vykazuje na rozdíl od FAP jen slabou endopeptidasovou aktivitu, po připojení objemných a blokujících aromatických skupin na N-konec dipeptidu není DPP-IV schopna takový substrát štěpit. V kontrastu s tím FAP preferenčně a efektivně štěpí N-blokované substráty (Aertgeerts et al., 2005). Na základě tohoto rozdílu byla vytvořena série inhibitorů pro FAP, zajišťující selektivitu vůči DPP-IV.

Prvním ze série inhibitorů byl Val-boroPro (PT-100, komerční název talabostat), který se boronovou skupinou na prolinu (Obr. 5) váže na katalytický serin v aktivním místě FAP. I přes svou neselektivitu vůči ostatním zástupcům rodiny prolyloligopeptidas se talabostat dostal až do druhé fáze klinického testování s pacienty trpícími kolorektálním karcinomem. V klinické studii však neobstál, především z důvodu toxicity ve vyšších dávkách (Narra et al., 2007). Úspěch nebyl zaznamenán ani při podávání s dalšími podpůrnými cytostatiky u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (Eager et al., 2009). V řadě malých molekul založených na boronové skupině následoval inhibitor vycházející z podobné struktury, avšak s připojeným aromatickým zbytkem na N-konci (Obr. 5) (Poplawski et al., 2013). Právě připojený pyridinový zbytek zajistil selektivitu vůči DPP-IV, kdy se využilo již popsaného rozdílu v preferenci štěpení N-

blokových substrátů mezi FAP a DPP-IV. Ze stejného principu vycházeli i Jansen et al., kteří připravili variantu nové řady specifického inhibitoru FAP (Obr. 5). Na N-konec inhibitoru připojili chinolin, tedy ještě objemnější aromatický substituent, a boronovou kyselinu na prolinu nahradili nitrilem, který stejně tak váže serin v aktivním místě enzymu. Tím vylepšili inhibiční schopnost molekuly pro FAP a zároveň selektivita vůči DPP-IV zůstala zachována (Jansen et al., 2013). V navazující publikaci o rok později Jansen et al. připravili různě modifikované verze předchozího inhibitoru a následně vybrali inhibitor substituovaný dvěma atomy fluoru na prolinu jako nejvíce potentní a selektivní vůči homologům FAP (Obr. 5), navíc také s příznivými farmakologickými vlastnostmi (Jansen et al., 2014).

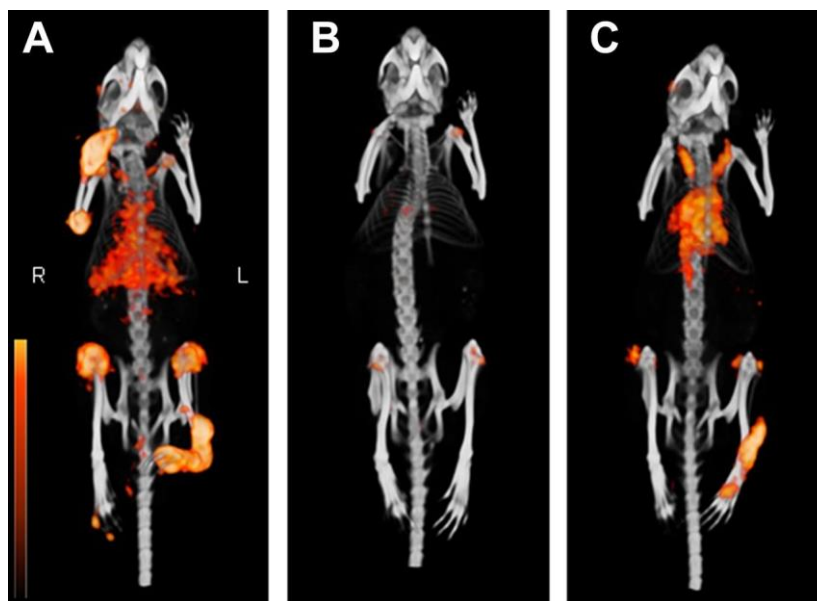


Obr. 5: Struktury inhibitorů FAP. a) Talabostat (Val-boroPro inhibitor), jeden z prvních inhibitorů FAP, neselektivní vůči DPP-IV. b) Inhibitor vycházející z talabostatu, s boronátovou skupinou a s připojeným pyridinem na N-konci, zajišťující selektivitu vůči DPP-IV. c) Zástupce skupiny inhibitorů s nitrilem a s objemným chinolinovým zbytkem na N-konci pro selektivitu vůči DPP-IV. d) Modifikovaný inhibitor „c“ se dvěma atomy fluoru na prolinu pro zvýšení selektivity.

2.3.3 Molekuly pro zobrazování FAP v diagnostice

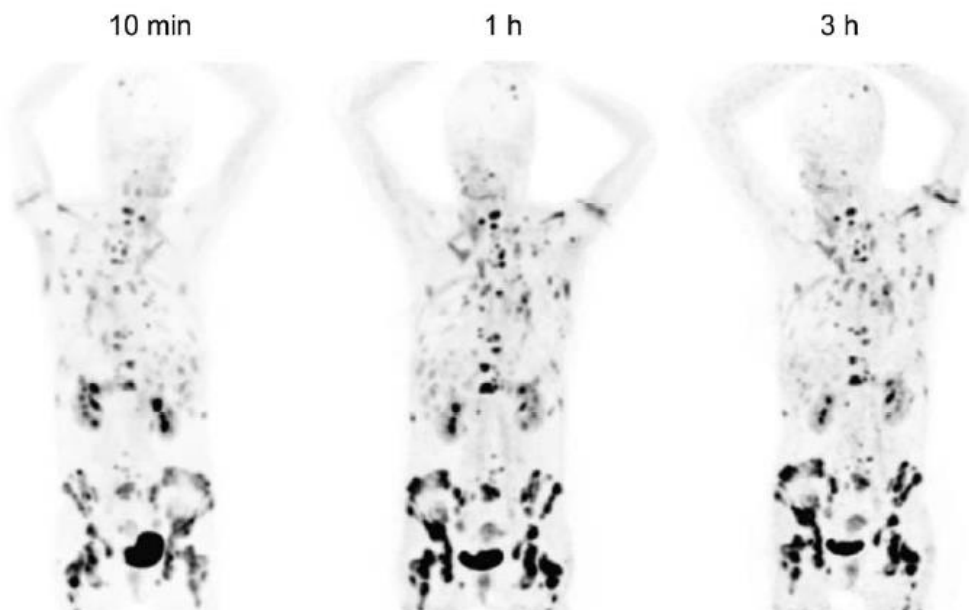
Pro svou expresi na stromálních fibroblastech a také v některých případech na vlastních nádorových buňkách se FAP stal nejen terapeutickým cílem, ale také cílem diagnostickým pro zobrazení nádorů pozitivních na FAP. Pro tyto účely byly vyvinuty fluorescenčně aktivovatelné liposomové částice nesoucí anti-FAP scFv fragment protilátky. Tyto částice se stanou fluorescenčními specificky až po zacílení na nádory exprimující FAP a pohlcení buňkami. Tento systém se ukázal jako funkční i *in vivo* na xenograftech v myších modelech a slibují detekční nástroj pro diagnostiku patologií spojených s vysokou expresí FAP (Rüger et al., 2014).

Po objevu exprese FAP ve fibroblastoidních synoviálních buňkách spojených s revmatoidní artritidou (Bauer et al., 2006), byla vyvinuta sonda v podobě radioaktivně značené protilátky proti FAP jako zobrazovací nástroj kloubů a tkání postižených tímto onemocněním. ^{111}In -28H1 protilátka prokázala schopnost účinně a s vysokým rozlišením značit artritické klouby v myších modelech, přičemž množství signálu odpovídalo závažnosti zánětu. Kontrolní protilátka necílicí FAP ^{111}In -DP47GS byla také akumulována v postižených kloubech, ale s menší účinností a signál se nezvyšoval se závažností onemocnění (dle tzv. skóre artritidy). ^{111}In -28H1 navíc zobrazila i menší oblasti postižené artritidou, jako jsou část chodidel a prsty, a stejně tak klouby s velmi nízkým skóre artritidy (Obr. 6). Radioaktivně značený analog glukosy ^{18}F -fluorodeoxyglukosa (^{18}F -FDG), který se akumuluje v zánětlivých buňkách a užívá se často k zobrazování zánětlivých onemocnění, byl ve srovnání s ^{111}In -28H1 mnohem méně účinný. Detekce FAP by tak mohla přinést nový příspěvek v diagnostice revmatoidní artritidy, při použití radioaktivní sondy také jako neinvazivní metoda pro sledování odpovědi na terapii (Laverman et al., 2015).



Obr. 6: Trojrozměrné zobrazení myši s artritidou indukovanou kolagenem („CIA mice“ – collagen-induced arthritis) pomocí radioaktivně značených protilátek metodou jednofotonové emisní výpočetní tomografie/výpočetní tomografie (SPECT/CT). A) Specifická protilátka proti FAP ^{111}In -28H1 v CIA myši, snímáno 24 hod po injekci. B) Specifická protilátka proti FAP ^{111}In -28H1 ve zdravé kontrolní myši, snímáno 72 hod po injekci. C) Kontrolní protilátka necílicí FAP ^{111}In -DP47GS v CIA myši, snímáno 24 hod po injekci (Laverman et al., 2015).

Nedávná studie (Lindner et al., 2018) představuje diagnosticko/terapeutický nástroj pro detekci FAP v nádorech založený na struktuře inhibitoru FAP, vycházejícího z publikace Jansen et al 2014. K tomuto inhibitoru byla připojena chelatační skupina DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina). Po chelataci izotopu ^{68}Ga a otestování tohoto konjugátu inhibitoru s DOTA na myších modelech byl tento konjugát následně použit pro zobrazení nádoru pomocí pozitronové emisní tomografie/výpočetní tomografie (PET/CT) na pacientech s metastázami karcinomu prsu. Konjugát prokázal výraznou akumulaci v metastázách, bez zadržování v parenchymu ledvin a dalších orgánech (radioaktivita byla zaznamenána pouze v ledvinové pánvičce a v močovém měchýři (Obr. 7). Při použití terapeutického nuklidu ^{90}Y došlo u pacienta také ke snížení bolesti (Lindner et al., 2018).



Obr. 7: Zobrazení metastáz v pacientech s karcinomem prsu pomocí inhibitoru FAP s DOTA chelatující ^{68}Ga v různých časech od intravenózního podání. PET/CT prokázalo účinnou akumulaci této sondy v metastázách, mimo to také v ledvinové pánvičce a v močovém měchýři. Hladina radioaktivity v normální zdravé tkáni byla velmi nízká (Lindner et al., 2018).

2.4 Náhrady protilátek v biomedicíně

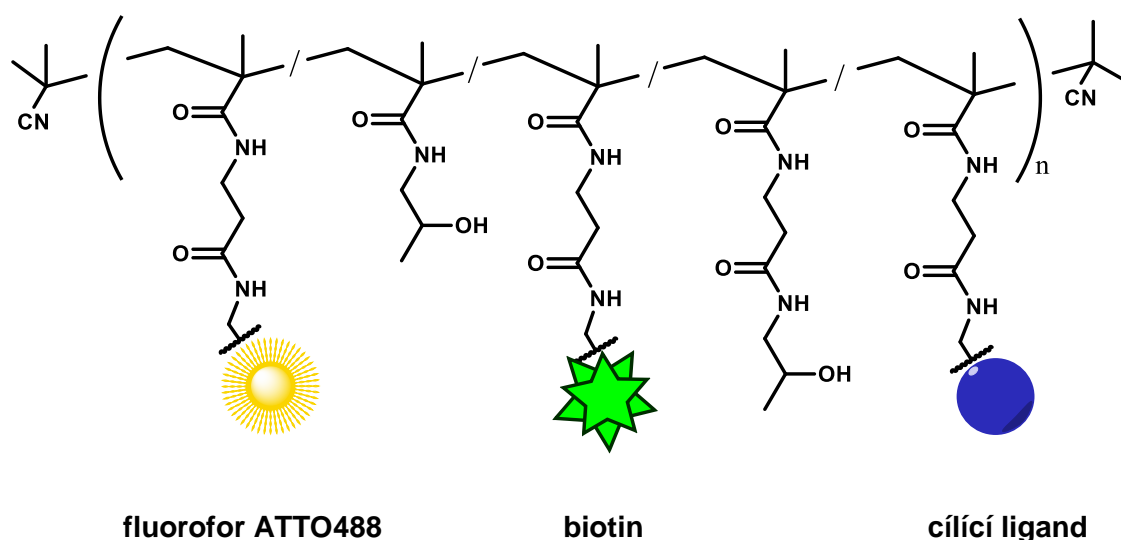
Protilátky nachází již několik desetiletí své uplatnění ve výzkumu, v diagnostice a v terapii díky výhodám jako je jejich specifita a vysoká afinita. Ani tyto přednosti však nezabránily dalšímu vývoji ve směru náhrad protilátek právě z důvodu jejich zásadních nevýhod. Nákladná produkce a využívání zvířat, často také nestabilita či vůbec nemožnost protilátky připravit, si částečně vyžádaly v této oblasti přesun k syntetickým náhradám protilátek (shrnutí v Yu et al., 2017). Mezi těmito náhradami, tzv. protilátkovými mimetiky, našly své uplatnění různé typy těchto molekul, např. „affibodies“ (Nord et al., 1997), DARPiny (Binz et al., 2003), affitiny (Correa et al., 2014), avimery (Silverman et al., 2005), či aptamery (Cox et al., 2002; Ellington and Szostak, 1990).

Z uvedených příkladů představují „DARPiny“ (DARPin; z angl. designed ankyrin protein repeats) proteiny o velikosti kolem 14 kDa, které jsou odvozeny z přírodních ankyrinových proteinů, zprostředkovávajících vysokoafinitní protein-proteinové interakce. Jejich velikost, související s lepší prostupností do tkání, a především

levná produkce, z nich vytvořily jedny z úspěšných náhrad protilátek (Binz et al., 2003) . Takto se například osvědčil DARPin pod označením MP0250, který inhibuje VEGF a hepatocytární růstový faktor (HGF) a tím následně potlačuje růst nádorů. Nyní je MP0250 testován v klinických studiích (Fiedler et al., 2017).

2.4.1 Polymerní konjugáty jako protilátková mimetika

Se stejným záměrem vytvoření náhrady protilátek pro biomedicínské účely, které by byly stabilní, snadno a levně produkovatelné, vznikla na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky ve spolupráci s Ústavem makromolekulární chemie Akademie věd České republiky protilátková mimetika nazvaná iBodies (Šácha et al., 2016). Tyto konjugáty využívají jako základ *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidovou (HPMA) kopolymerovou kostru s následně připojenými nízkomolekulárními ligandy. Název iBodies byl odvozen ze spojení i = inhibitor, bodies = antibodies. Výhodami kopolymeru HPMA je jeho rozpustnost ve vodě, biokompatibilita, stabilita a netoxičita (Sprincl et al., 1971). HPMA prekuzor umožňuje díky reaktivním skupinám kovalentní připojení nejrozumnějších ligandů (Šubr and Ulbrich, 2006). Základní podobou iBodies je kombinace tří takových skupin: fluorofor (např. ATTO488) sloužící k vizualizaci konjugátu, biotin jako afinitní kotva pro imobilizaci a cílicí ligand (například inhibitor cílového enzymu), který definuje konjugát jako nástroj pro studium daného enzymu či proteinu (Obr. 8). Tento nový systém našel uplatnění v klasických biochemických metodách, ve kterých jsou běžně využívány protilátky (konfokální mikroskopie, průtoková cytometrie, ELISA, imunoprecipitace) (Šácha et al., 2016).



Obr. 8: Schematické znázornění polymerního konjugátu (iBodies) založeného na kopolymerním řetězci *N*-2-(hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA) s navázanými funkčními skupinami – fluorofor ATTO488 pro vizualizaci konjugátu, biotin pro imobilizaci a cílíci ligand pro vazbu na daný protein či enzym (Šácha et al., 2016).

2.4.2 Cílené doručování léčiv pomocí polymerních konjugátů

HPMA kopolymery byly vyvinuty v 60. letech v Praze Prof. Jindřichem Kopečkem (Kopeček and Bažilová, 1973). Tyto kopolymery byly dlouhou dobu užívány pro doručování léčiv do nádorů, avšak jednalo se většinou pouze o HPMA řetězec s navázanou účinnou látkou, kdy dochází k zadržování těchto vysokomolekulárních látek v nádorech (tzv. efekt zvýšené permeability a retence, EPR efekt; z angl. enhanced-permeability and retention effect) (Noguchi et al., 1998).

EPR efekt způsobuje, že látky s vysokou molekulovou hmotností jako jsou polymerní konjugáty, jsou preferovaně akumulovány v pevných nádorech, přičemž účinnost tohoto jevu je závislá na molekulové hmotnosti (čím větší částice je, tím více je v nádoru zadržována) – ve srovnání s nízkomolekulárními látkami, které snadno difuzí unikají zpět do krevního řečiště (Matsumura and Maeda, 1986; Noguchi et al., 1998). HPMA kopolymery přinesly pro svoje vlastnosti do tohoto systému výhody, kdy po připojení jinak ve vodě nerozpustných léčiv dochází ke zvýšení jejich rozpustnosti, také k prodloužení jejich stability v krvi a k ovlivnění farmakokinetiky léčiva (Van et al., 2010). HPMA kopolymer konjugovaný s doxorubicinem (chemoterapeutikum) se dostal

do druhé fáze klinického testování, kde byla prokázána jeho akumulace v nádorech pacientů s karcinomem prsu a plic. Doxorubicin vykazoval po navázání na HPMa kopolymer sníženou toxicitu ve srovnání s ekvivalentní dávkou volné molekuly a u některých pacientů v první fázi studie bylo navíc pozorováno zmenšování velikosti nádorů (Seymour et al., 2009; Vasey et al., 1999).

Protože současná věda se v tématu protinádorové léčby opírá především o aktivní doručování léčiv do nádorů, cílené specificky na významné nádorové markery (namísto pasivních způsobů, jakým je EPR efekt), výhodné vlastnosti HPMa kopolymerů v kombinaci s cílicími ligandy a doručovaným léčivem jsou směrem, kterým se oblast polymerních konjugátů ubírá.

3 Cíle práce

Cílem práce bylo vyvinout a charakterizovat polymerní konjugát jako protilátkové mimetikum pro specifické cílení fibroblastového aktivačního proteinu (FAP).

Díličími cíli bylo:

- připravit rekombinantní proteiny FAP a jeho blízký homolog dipeptidylpeptidasu IV (DPP-IV)
- vybrat inhibitor FAP pro připojení na kopolymer *N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu a změřit selektivitu inhibitoru i vzniklého polymerního konjugátu vůči DPP-IV
- otestovat možné použití polymerního konjugátu cílicího FAP v biochemických metodách (konfokální mikroskopie, průtoková cytometrie, imunoprecipitace, ELISA, Western blot)
- otestovat schopnost cytotoxické verze konjugátu specificky zabíjet buňky exprimující FAP

4 Materiály a metody

4.1 Materiály, chemikálie, roztoky

Affymetrix (USA) – oktaethylenglykol monododecylether

Biacore (Švédsko) – NHS, EDC

Bio-Rad (USA) – All blue standard marker pro SDS-PAGE

Biotium (USA) - GelRed

Clontech (USA) – pTet-On-Advanced plasmid, hygromycin, puromycin, doxycyklin

Gibco – L-glutamin, Opti-MEM, kvasničný autolýzát, lipidový koncentrát, SF900II médium

IBA Lifescience (Německo) – Strep-Tactin, BioLock

In Vitro Scientific – Petriho miska

Invitrogen (USA) – Lipofectamin 2000, *Drosophila* S2 buňky, Calcium Phosphate Transfection Kit

Lach-Ner (Česká republika) – dusičnan stříbrný

LI-COR Biosciences (USA) – IRDye® 800CW Streptavidin konjugát

Millipore (USA) – filtr Sterivex GP 0,22 µm

New England Biolabs (USA) – restrikční endonukleasy, T4 DNA ligasa, Phusion HF DNA polymerasa

Penta (Česká republika) – kyselina octová, glycerol, methanol, formaldehyd, chlorid sodný, uhličitán sodný, kyselina chlorovodíková, thiosíran sodný

Pierce (USA) – D-biotin

Qiagen (Německo) – QIAquick Gel Extraction Kit, GelPilot DNA molecular weight marker

Roche (Česká republika) – Streptavidin Mutein Matrix, The Cell Proliferation Kit II, High Pure Plasmid Isolation Kit

SDT (Německo) – Casein Buffer 20X-4X Concentrate

Serva (Německo) – bromfenolová modř, agarosa

Sigma-Aldrich (USA) – EDTA, Tris, LB médium, FBS, D-desthiobiotin, SDS, 2-merkaptóethanol, glycin, substrát Gly-Pro-AMC, Hoechst Stain Solution H34580, Tween-20, Triton X-100, DMEM, ethanolamin, akrylamid, N,N'-metylen-bis(akrylamid), 96jamková destička černá (Greiner, „U“ tvar dna), tetramethylethylendiamin

Solulink (USA) – Streptavidin Agarose Ultra Performance

Thermo Fisher Scientific (USA) – Neutravidin-HRP, polypropylenová kolonka na 5 ml, Nunc 96jamková destička Maxisorb

Top-Bio (Česká republika) – směs deoxyribonukleotidů

Roztoky

Pokud není v textu uvedeno jinak, pak:

TBS:

50 mM Tris-HCl

137 mM NaCl

pH 7,6

PBS:

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

pH 7,4

TBST'/PBST': TBS/PBS s 0,05% Tween 20

TBST/PBST: TBS/PBS s 0,1% Tween 20

4.2 Příprava plasmidů pro expresi FAP a DPP-IV

Plasmid kódující Strep-tag a Flag-tag (SF-tag) pMT/BiP/SF-PSMA jsme obdrželi od Dr. Cyrila Bařinky (Biotechnologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.) (Barinka et al., 2016). Plasmid kódující Avi-tag (pMT/BiP/Avi-GCPII) byl připraven již dříve v naší laboratoři (Tykvart et al., 2012). DNA sekvenci kódující lidský FAP jsme získali v pTRE-Tight plasmidu společně se sekvencí lidské DPP-IV také v plasmidu pTRE-Tight od prof. MUDr. Aleksi Šeda, DrSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Sekvence DNA kódující celkodélkové formy myších variant FAP a DPP-IV jsme získali z myších cDNA knihoven – pro myší FAP byla použita cDNA připravena z myší dělohy, pro DPP-IV z myšího srdce.

Sekvence DNA kódující extracelulární část lidského (aminokyseliny 26-760) a myšího FAP (aminokyseliny 26-761) byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro amplifikaci byly použity primery a podmínky zaznamenané níže (Tab. 1, 3-5, 7, 8). Produkty amplifikace byly vloženy přes restrikční místa *Bgl*II a *Xho*I do rozštěpeného plasmidu pMT/BiP/SF-PSMA (Barinka et al., 2016). Takto byly připraveny výsledné expresní plasmidy pMT/BiP/SF-hFAP (kódující lidský FAP) a pMT/BiP/SF-mFAP (kódující myší FAP).

Analogicky byly sekvence DNA kódující extracelulární část lidské (aminokyseliny 29-766) a myší DPP-IV (aminokyseliny 29-760) amplifikována pomocí PCR. Pro amplifikaci byly použity primery a podmínky zaznamenané níže (Tab. 2-4, 6-8). Vzniklé konstrukty byly vloženy přes *Bcl*I a *Xho*I (pro lidskou DPP-IV) a *Bam*HI a *Xho*I (pro myší DPP-IV) restrikční místa do rozštěpeného plasmidu pMT/BiP/Avi-GCPII pomocí *Bgl*II/*Xho*I. Tímto způsobem byly vytvořeny expresní plasmidy pMT/BiP/Avi-hDPP-IV (kódující lidskou DPP-IV) a pMT/BiP/Avi-mDPP-IV (kódující myší DPP-IV).

4.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tab. 1: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci extracelulární části lidského FAP.

složka PCR reakce	množství
templátová DNA (pTRE-Tight hFAP)	10 ng
primer F-26_hFAP-Bg/II (20 µM)	1 µl
primer R-760_hFAP-XhoI (20 µM)	1 µl
směs deoxyribonukleotidů (10 mM)	1 µl
Phusion TM HF pufr (5×)	10 µl
Phusion [®] HF DNA polymerasa (2U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	do 50 µl

Tab. 2: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci extracelulární části lidské DPP-IV.

složka PCR reakce	množství
templátová DNA (pTRE-Tight hDPP-IV)	10 ng
primer F-29_hDPP-IV-BcII (20 µM)	1 µl
primer R-766_hDPP-IV-XhoI (20 µM)	1 µl
směs deoxyribonukleotidů (10 mM)	1 µl
Phusion TM HF pufr (5×)	10 µl
Phusion [®] HF DNA polymerasa (2U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	do 50 µl

Tab. 3: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci extracelulární částí lidských variant FAP a DPP-IV.

Teplota [°C]	Délka trvání cyklu	Počet cyklů
98	30 s	1
98	10 s	30
66	30 s	
72	90 s	
72	10 min	1

Tab. 4: Sekvence primerů pro amplifikaci extracelulárních částí lidských variant FAP a DPP-IV.

F-26_hFAP- <i>Bgl</i> II	5'-AAAAGATCTTTACGCCCTTCAAGAGTT-3'
R-760_hFAP- <i>Xho</i> I	5'-AAACTCGAGTTAGTCTGACAAAGAGAAACA-3'
F-29_hDPP-IV- <i>Bcl</i> II	5'-AAATGATCAAACAAAGGCACAGATGAT-3'
R-766_hDPP-IV- <i>Xho</i> I	5'-AAACTCGAGTTAGGGCAGAGAGAAACATTGTTTTAT-3'

Tab. 5: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci extracelulární části myšího FAP.

složka PCR reakce	množství
templátová DNA (cDNA z myší dělohy)	1 µl
primer F-26_mFAP- <i>Bgl</i> II (20 µM)	1 µl
primer R-761_mFAP- <i>Xho</i> I (20 µM)	1 µl
směs deoxyribonukleotidů (10 mM)	1 µl
Phusion TM HF pufr (5×)	10 µl
Phusion [®] HF DNA polymerasa (2U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	do 50 µl

Tab. 6: Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci extracelulární části myší DPP-IV.

složka PCR reakce	množství
templátová DNA (cDNA z myšího srdce)	1 µl
primer F-29_mDPP-IV- <i>Bam</i> HI (20 µM)	1 µl
primer R-760_mDPP-IV- <i>Xho</i> I (20 µM)	1 µl
směs deoxyribonukleotidů (10 mM)	1 µl
Phusion TM HF pufr (5×)	10 µl
Phusion [®] HF DNA polymerasa (2U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	do 50 µl

Tab. 7: Podmínky PCR reakce pro amplifikaci extracelulární částí myších variant FAP a DPP-IV.

Teplota [°C]	Délka trvání cyklu	Počet cyklů
98	30 s	1
98	10 s	30
66 (pro FAP) 71 (pro DPP-IV)	30 s	
72	90 s	
72	10 min	1

Tab. 8: Sekvence primerů pro amplifikaci extracelulárních částí myších variant FAP a DPP-IV

F-26_mFAP-BglII	5'-AAAAGATCTTTACGTCCCTCAAGAGTT-3'
R-761_mFAP-XhoI	5'-AAACTCGAGTCAGTCTGATAAAGAAAAGCA-3'
F-29_mDPP-IV-BamHI	5'-AAAGGATCCAGCAAAGATGAAGCGGCA-3'
R-760_mDPP-IV-XhoI	5'-AAACTCGAGCTAGTGTAAGGAGAAGCACTG-3'

Amplifikovaná DNA byla rozdělena pomocí agarosové elektroforézy (1% (w/v) agarosa v Tris-acetátovém pufru (40 mM Tris-HCl; 20 mM CH₃COOH; 1 mM EDTA; pH 8,0) s fluorescenčním barvivem GelRed (ředění 1:40 000). Fragmenty DNA byly vyříznuty a extrahovány z gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) dle doporučeného postupu výrobcem.

4.2.2 Restrikční štěpení, ligace a transformace kompetentních bakterií

Získaná DNA a plasmidy pro ligaci byly štěpeny restrikčními endonuklasami dle doporučených podmínek (teplota, čas) výrobcem enzymů (New England BioLabs). Reakce byly prováděny v objemu 50 µl. Ligační reakce probíhaly v objemu 10 µl, při 16 °C, 12 hod, za použití T4 DNA ligasy (New England BioLabs) v množstevním poměru plasmid:insert 1:3.

5 µl ligační reakce bylo smícháno s 45 µl kompetentních buněk *Escherichia coli* Mach1 a inkubováno 30 min na ledu. Poté byl proveden tepelný šok 90 s při 42 °C s následným okamžitým zchlazením po dobu 60 s na ledu. K bakteriím bylo přidáno 500

μl studeného LB média (Sigma-Aldrich) a proběhla inkubace po dobu 60 min při 37 °C. 200 μl suspence buněk bylo rozetřeno na Petriho misku s LB médiem (Sigma-Aldrich) a ampicilinem (100 μg/ml) a misky by uloženy přes noc v termostatu při 37 °C.

4.2.3 Minipreparace plasmidové DNA

Následující den byly vybrané kolonie zaočkovány do 12 ml nového LB média (Sigma-Aldrich) s ampicilinem (100 μg/ml) a inkubovány 14 hod při 37 °C a 220 ot/min. Narostlé bakterie byly poté centrifugovány (5200×g, 10 min, 4 °C). Plasmidová DNA byla z pelety bakterií izolována pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

4.3 Příprava stabilních transfektantů

Pro transfekci FAP do savčí buněčné linie U251MG_TetOn (CVCL_0021) byl použit plazmid pTRE-Tight_hFAP, který jsme obdrželi od prof. MUDr. Aleksi Šeda, DrSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Buněčná linie U251MG_TetOn (stabilně transfekovaná plasmidem pTet-On-Advanced) umožňuje regulovatelnou expresi cílového proteinu doxycyklinem. Buňky U251 rostly na 35mm misce v DMEM médiu (Sigma-Aldrich) a byly transfekovány 2,15 μg plasmidu pTRE-Tight_hFAP a 0,15 μg plasmidu pPur pro selekci puromycinem za použití Lipofectaminu 2000 (Invitrogen). Reakce byla smíchána ve finálním objemu 115 μl bezsérového média Opti-MEM (Gibco), ponechána 15 min při 20 °C a poté opatrně po kapkách přidána k buňkám. Po 24 hod inkubace při 37 °C byly buňky přeneseny na 100mm misky a zde dále kultivovány. Stabilní klony byly selektovány v přítomnosti puromycinu (Clontech) o koncentraci 0,5 μg/ml. Exprese FAP (v případě U251_FAP+ buněk) byla indukována přidáním doxycyklinu (Clontech) o koncentraci 1 μg/ml do kultivačního média DMEM s 10% FBS (Sigma-Aldrich).

4.4 Exprese rekombinantních proteinů FAP a DPP-IV

Extracelulární část lidského a myšího FAP a lidské a myší DPP-IV byly exprimovány dle již dříve vyvinutého protokolu v naší laboratoři (Tykvart et al., 2012). Pro avi-tagované verze rekombinantních proteinů byly použity *Drosophila* S2 buňky stabilně transfekované plasmidem pMT/BiP/BirAKDEL kódujícím BirA biotin ligasu, která zajišťuje biotinylací sekvence avi-tagu. Buňky rostly na 35mm misce v médiu SF900II (Gibco) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich) při teplotě 25 °C. Poté byly transfekovány pomocí Calcium Phosphate Transfection Kit (Invitrogen) dle

protokolu popsaného výrobcem. Transfekční směs obsahovala 9 µg plasmidu pMT/BiP/Avi-DPP-IV a 0,5 µg selekčního plasmidu pCoBlast pro selekci vůči blasticidinu-S a po smíchání s dalšími složkami kitu byla inkubována 30 min při 25 °C. Poté byla směs opatrně po kapkách přidána k buňkám, následně byly buňky inkubovány 24 hod při 25 °C a přeneseny do nového média (SF900II s 10% FBS). Buňky byly selektovány v přítomnosti hygromycinu (300 µg/ml) a blasticidinu-S (5 µg/ml). Selektované stabilní transfektanty byly poté přeneseny v médiu SF900II do nádoby o objemu 250 ml (Bellco) a naředěny přibližně na koncentraci 1×10^6 buněk/ml čerstvým médiem (100 ml). Takto buňky rostly při 25 °C, 100 ot/min v přítomnosti 1 ml lipidového koncentrátu 100× (Gibco) a 2 ml kvasničného autolyzátu (50× koncentrát (Gibco)). Poté, co buňky narostly na koncentraci 1×10^7 buněk/ml, byly naředěny 400 ml čerstvého média do nádoby o objemu 3 l, opět s přidáním lipidového koncentrátu a autolyzátu ve stejném objemovém poměru k přidanému médiu. Exprese proteinu byla indukována 100 mM CuSO₄ (do výsledné koncentrace 1 mM). Poté bylo k buňkám přidáno 5 ml 20% D-glukosy a 2,5 ml 200 mM L-glutaminu.

Analogicky byl exprimován lidský SF-FAP (stabilní transfekce plasmidem pMT/BiP/SF-hFAP), s rozdílem, že byly použity buňky *Drosophila* S2 (bez stabilní transfekce plasmidem pMT/BiP/BirAKDEL, který je nutný pouze pro expresi avi-tagovaných proteinů).

Purifikace lidských a myších variant SF-FAP a Avi-DPP-IV byly provedeny podle již popsaného protokolu (Barinka et al., 2016; Tykvart et al., 2012). Médium *Drosophila* S2 buněk obsahující rekombinantní proteiny bylo zakoncentrováno desetkrát pomocí přístroje LabScale TFF System (Millipore) s Pellicon XL 50 Cassette, Biomax 100. Proteiny byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie s využitím Strep-Tactinu jako nosiče pro zachycení SF-FAP nebo s využitím Streptavidin Muteinu pro zachycení Avi-DPP-IV (viz dále).

4.4.1 Purifikace Avi-DPP-IV přes Avi-tag

Zakoncentrované médium bylo smícháno v poměru 2:1 s ekvilibračním pufrem (300 mM Tris-HCl, 450 mM NaCl, pH 7,2) a centrifugováno (5250×g, 10 min). Poté byl k médiu přidán 1 ml nosiče Streptavidin mutein matrix (Roche) a médium bylo ponecháno na míchačce přes noc ve 4 °C. Médium s nosičem bylo nanášeno na separační kolonku a frakce, která protekla, byla zachycena (FT). Nosič byl promyt 50 ml promývacího pufru (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2; frakce W1), poté 1 ml

stejného pufru (frakce W2). Následně byl na nosič aplikován 1 ml elučního pufru (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM D-biotin; pH 7,2; E1) a těsně před protečením celého objemu, byl sloupec zespodu uzavřen a nosič byl takto ponechán v elučním pufru 1 hod. Poté byly opakovaným nanesením 1 ml pufru posbírány další čtyři eluční frakce (E2-E5). Všechny frakce z průběhu purifikace byly smíchány s SDS vzorkovým pufrem, denaturovány zahřátím (98 °C, 10 min), nanесeny na gel, elektroforeticky rozděleny (140 V, 1 hod) a proteiny byly vizualizovány obarvením stříbrem (Tab. 9).

4.4.2 Purifikace SF-FAP přes Strep-tag

K zakoncentrovanému médiu bylo přidáno 2,4 ml BioLocku (IBA Lifesciences) a poté bylo přefiltrováno přes filtr Sterivex GP 0,22 µm (Millipore). Na separační kolonku byly nanесeny 3 ml suspenze nosiče Strep-Tactin (IBA Lifesciences). Nosič byl promyt 15 ml promývacího pufru (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0). Médium bylo nanесeno na nosič v kolonce a frakce, která protekla, byla zachycena (FT). Nosič byl promyt nejprve 40 ml promývacího pufru (frakce Wash 1) a poté 1 ml (frakce Wash 2). Sloupec byl na 30 min zespodu uzavřen a na nosič byly aplikovány 4 ml elučního pufru (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM D-desthiobiotin (Sigma-Aldrich); pH 8,0); po 30 min byla frakce zachycena (E1). Poté opakovaným nanášením 4 ml promývacího pufru byly získány další dvě eluční frakce (E2, E3). Jednotlivé frakce z průběhu purifikace byly smíchány s SDS vzorkovým pufrem, denaturovány zahřátím (98 °C, 10 min), nanесeny na gel, elektroforeticky rozděleny (140 V, 1 hod) a vizualizovány barvením stříbrem (Tab. 9).

Roztoky pro SDS-PAGE:

vzorkový pufr (6×): 350 mM Tris-HCl, pH 6,8; 30% (v/v) glycerol; 10% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 6% (v/v) 2-merkptoethanol; 0,012% (w/v) bromfenolová modř

zaostřovací gel (6%): 250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 5,5% (w/w) akrylamid, 0,15% (w/w) N,N'-methylen-bis(akrylamid); 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 0,005% (v/v) tetramethylethylendiamin; 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný

separační gel (11%): 313 mM Tris-HCl (pH 8,8); 10,25% (w/w) akrylamid, 0,25% (w/w) N,N'-methylen-bis(akrylamid); 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 0,001% (v/v) tetramethylethylendiamin; 0,1% (w/v) peroxodisíran amonný

elektrodový pufr (5×): 125 mM Tris-HCl pH 8,8; 1,25 M glycin; 0,5% (w/w) dodecylsulfát sodný (SDS)

Tab. 9 Postup barvení stříbrem:

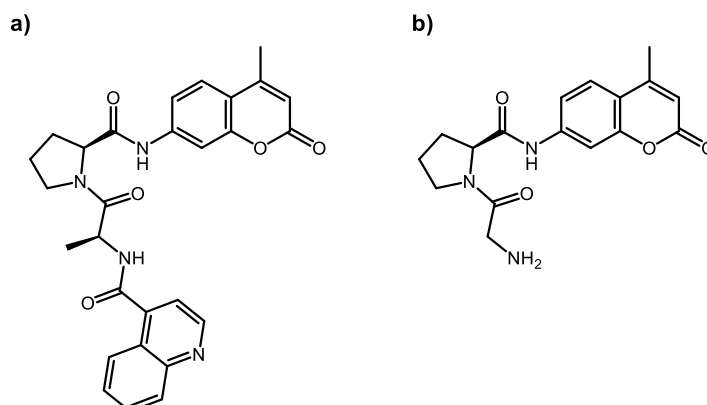
1	fixace	20 min	12% (v/v) kys. octová; 50% (v/v) methanol; 0,02% (v/v) formaldehyd
2	promytí	3 × 10 min	50% (v/v) methanol
3	exponace	1 min	0,02% (w/v) thiosíran sodný
4	promytí	3 × 20 s	destilovaná voda
5	impregnace	20 min	0,2% (w/v) dusičnan stříbrný; 0,02% (v/v) formaldehyd
6	promytí	3 × 20 s	destilovaná voda
7	vyvolání	10 s - 5 min	566 mM uhličitan sodný; 16 µM thiosíran sodný; 0,02% (v/v) formaldehyd
8	promytí	3 × 20 s	destilovaná voda
9	zastavení	10 min	12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol
10	uchování		50% (v/v) kyselina octová

4.5 Měření inhibice enzymové aktivity FAP a DPP-IV

Hodnoty inhibičních konstant (IC_{50}) pro všechny inhibitory a polymerní konjugát byly stanoveny pomocí fluorescenční spektrofotometrie s využitím fluorogenních substrátů FAP a DPP-IV. V případě FAP se jednalo o substrát specifický pro FAP [*N*-(chinolino-4-karbonyl)-Ala-Pro-7-amino-4-methylkumarin] (Keane et al., 2013), který byl připraven Dr. Jiřím Schimerem na ÚOCHB AVČR (Obr. 9). Měření bylo provedeno v černé 96-jamkové destičce (tvar dna „U“, Greiner). V každé jamce bylo smícháno 0,5 ng SF-hFAP v PBS obsahující 0,001% oktaethylenglykol monododecylether (Affymetrix) s inhibitorem/polymerním konjugátem ve finálním objemu 70 µl. Použité koncentrace inhibitorů byly zvoleny tak, aby byl pokryt rozsah inhibice mezi 0-100% relativní inhibice (inhibiční křivka sigmoidního tvaru). Reakce byly nejprve inkubovány 5 min ve 37 °C a poté bylo přidáno 30 µl 500 µM substrátu FAP (Obr. 9). Fluorescence byla měřena v kinetickém módu přístrojem Tecan Infinite M1000 PRO při excitační vlnové délce 380 nm a emisní vlnové délce 460 nm. Naměřená data byla poté analyzována a hodnoty IC_{50} byly získány použitím programu GraFit v.5.0.11 (Erithacus Software Ltd.).

Měření inhibice enzymové aktivity DPP-IV bylo provedeno analogicky: 0,5 ng DPP-IV v PBS obsahující 0,001% oktaethylenglykolu monododecyletheru (Affymetrix) s inhibitorem/polymerním konjugátem ve finálním objemu 70 µl. Po inkubaci 5 min

v 37 °C bylo přidáno 30 ul 166 μ M Gly-Pro-7-amino-4-methylkumarin (Gly-Pro-AMC; Sigma-Aldrich), substrátu DPP-IV (Obr. 9).



Obr. 9: Struktura specifického fluorogenního substrátu FAP [*N*-(chinolino-4-karbonyl)-Ala-Pro-7-amino-4-methylkumarin] (vlevo). Struktura substrátu pro DPP-IV Gly-Pro-AMC (vpravo).

4.6 Stanovení K_D pomocí povrchové plasmonové rezonance (SPR)

Stanovení disociační konstanty (K_D) mezi FAP a polymerním konjugátem bylo provedeno pomocí povrchové plasmonové rezonance (z anglického surface plasmon resonance, SPR) podle již dříve popsaného protokolu (Hegnerova et al., 2010; Pimková et al., 2012; Šácha et al., 2016). Nejprve byl čip pokrytý zlatou vrstvou derivatizován thiolalkanovými sloučeninami a připevněn ke skleněnému hranolu. Poté byly karboxylové skupiny aktivovány pomocí NHS/EDC [(*N*-hydroxysukcinimid/1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid] a následně byl aplikován roztok neutravidinu o koncentraci 20 ng/ μ l v 10 mM octanu sodném o pH 5,0. Pro odstranění nespecificky navázaného neutravidinu byl použit roztok PBS obsahující 0,5 M NaCl a následně 1 M ethanolamin pro inaktivaci nezreagovaných karboxylových skupin. Poté byl na neutravidin navázán polymerní konjugát (500 nM v PBS) skrze interakci neutravidin-biotin. Na takto vzniklou vrstvu byl aplikován rekombinantní lidský FAP ve čtyřech koncentracích (300 nM, 150 nM, 75 nM, 38 nM) a následně byl odmýván pomocí PBS po dobu 30 min. Získané křivky byly analyzovány pomocí interakčního modelu One-To-One v softwaru TraceDrawer v.1.5 (Ridgeview Instruments AB) pro získání k_{on} a k_{off} hodnot k následnému určení K_D .

4.7 Afinitní izolace („imunoprecipitace“) FAP z buněčného lyzátu

Pro přípravu buněčného lyzátu obsahující FAP byly použity stabilně transfekované U251_FAP+ buňky, narostlé na 100mm Petriho misce v DMEM médiu s 10% FBS a s 4mM L-glutaminem (Gibco) v přítomnosti 100 nM doxycyklinu. Buňkám bylo odebráno médium a poté byly opláchnuty PBS a pomocí 2 ml roztoku trypsin/EDTA [0,25 % (w/V) trypsin a 0,01 % (w/V) EDTA] odděleny od podkladu. Suspenze buněk byla přenesena zpět do média, centrifugována (250×g, 2 min) a promyta dvakrát 1 ml PBS. Buněčná peleta byla resuspendována v lyzačním pufru (450 µl roztoku na peletu získanou z jedné 100mm misky) o složení: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 10 µM pepstatin A, 20 µM E-64 s následnou sonikací po dobu 5 min v chlazené lázni. Roztok byl poté centrifugován (16 100×g, 10 min) a supernatant přenesen do nové mikrozkušavky.

Mezitím byl 1 ml 1µM anti-FAP polymeru a polymeru bez inhibitoru FAP (negativní kontrola) v TBST (TBS obsahující 0,1% Tween 20) nebo jen 1 ml TBST (negativní kontrola) inkubovány s 30 µl nosiče Streptavidin Agarose Ultra Performance (Solulink) po dobu 1 hod ve 4 °C. Nosič byl poté promyt dvakrát 1 ml TBS a inkubován s 900 µl desetkrát zředěného lyzátu v TBST po dobu 1,5 hod ve 4 °C. Poté byla odebrán supernatant (FT, frakce obsahující proteiny nenavázané na polymery) a nosič byl promytý třikrát 1 ml TBST. Proteiny byly nakonec eluovány (a zároveň denaturovány) 30 µl vzorkového pufru pro SDS-PAGE zahřátím na 98 °C po dobu 10 min. Jednotlivé získané frakce byly nakonec analyzovány pomocí SDS-PAGE a vizualizovány technikou barvení stříbrem.

4.8 Konfokální mikroskopie buněk exprimujících FAP

Stabilně transfekované buňky U251-FAP byly kultivovány v přítomnosti 100 nM doxycyklinu ve čtyřkomorové 35mm Petriho misce se skleněným dnem (In Vitro Scientific) v DMEM médiu s 10% fetálním bovinním sérem (FBS; Sigma-Aldrich) a 4 mM L-glutaminem do přibližně 60% konfluence. Další den bylo médium odstraněno, polymerní konjugáty (anti-FAP polymer a kontrolní polymer bez inhibitoru FAP) byly naředěny v čerstvém médiu bez séra (FBS) na finální koncentraci 200 nM a přidány k buňkám. Buňky byly inkubovány s polymery 1 hod v 37 °C. Před ukončením doby inkubace byl k buňkám na 10 min přidán roztok Hoechst Stain Solution H34580 (Sigma-Aldrich) ve finální koncentraci 0,5 µg/ml pro obarvení jader. Médium bylo poté

odstraněno, buňky byly opláchnuty dvakrát 500 μ l PBS a následně k nim bylo přidáno čerstvé médium obsahující sérum. Buňky byly pozorovány při 37 °C pomocí Zeiss LSM 780 mikroskopu s imerzním objektivem (Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27).

Pro sledování internalizace byly snímky vytvořeny po 1, 3, 6 a 21 hod od přidání polymerů. V případě Hoechst 34580 byl pro excitaci použit 405 nm diodový laser (maximální výkon 30 mW) při výkonu 1,1 % a emisní vlnové délky byla snímány ve škále od 410 do 585 nm (při napětí na detektoru: 750 V). V případě fluoroforu ATTO488 byl pro excitaci použit 488 nm iontový argonový laser o výkonu 1,8 % a emisní vlnové délky byly snímány od 490 do 630 nm (napětí na detektoru: 720 V). Všechny snímky byly vytvořeny při stejném nastavení mikroskopu a za použití softwaru ZEN 2011 (Carl Zeiss Microscopy).

4.9 Analýza buněk exprimujících FAP pomocí průtokové cytometrie

Pro experiment byly použity buňky U251_FAP+ (exprimující FAP), U251_FAP- (neexprimující FAP) a U251 (netransfekované FAP) narostlé na 100mm Petriho misce v DMEM médiu s 10% FBS a s 4mM L-glutaminem v přítomnosti 100 nM doxycyklinu (pro U251_FAP+) nebo bez doxycyklinu (pro U251_FAP-, U251). Médium bylo buňkám odebráno, buňky byly opláchnuty PBS, odděleny od podkladu pomocí 2 ml roztoku trypsin/EDTA [0,25 % (w/V) trypsin a 0,01 % (w/V) EDTA] a vráceny do média. Následně byly buňky centrifugovány (250 \times g, 3 min), promyty dvakrát 2 ml PBS s 10% FBS (PBS/FBS), resuspendovány v 500 μ l PBS/FBS a 1 hod inkubovány v 37 °C. Poté byla buněčná suspenze naředěna a přenesena do 96-jamkové polypropylenové destičky (s kulatým dnem) tak, aby bylo v každé jamce 90 μ l buněčné suspenze obsahující 1×10^5 buněk. K buňkám byly přidány testované polymery (200 nM finální koncentrace) a buňky byly inkubovány 1 hod v 37 °C. Poté byly buňky dvakrát promyty 200 μ l PBS/FBS a nakonec resuspendovány v 200 μ l PBS/FBS. Buněčná suspenze byla analyzována pomocí přístroje BD LSR FortessaTM cell analyzer (Becton, Dickinson and Company). Přístroj byl nastaven pomocí parametrů pro přímý a boční rozptyl tak, aby byly měřeny jednotlivé živé buňky. V každém vzorku bylo změřeno 20 000 událostí. Všechny experimenty byly měřeny v triplicátu a analyzovány pomocí programu BD FACSDivaTM. Histogramy reprezentující výsledky měření byly vytvořeny v programu FlowJo 10.

4.10 ELISA pro kvantitativní detekci FAP

Kvantitativní sendvičová ELISA byla provedena v 96jamkové destičce Maxisorb (Nunc). Do každé jamky byla sorbována myší monoklonální protilátka F-19 (obdržena od prof. MUDr. Aleksi Šeda, DrSc., Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy) proti FAP v borátovém pufru (100 mM borát, pH 7,4; 100 ng/jamku; 1 hod při pokojové teplotě). Povrch jamek byl poté zablokován 0,55% (w/v) kaseinem v TBS (Casein Buffer 20X-4X Concentrate, SDT; 12 hod při pokojové teplotě). Následně byl přidán rekombinantní lidský SF-FAP v koncentračním rozsahu 3 pg – 50 ng/jamku; 1 hod při pokojové teplotě). Po promytí jamek TBS s 0,05% Tween 20 (TBST'; 3×200 µl) byly jamky inkubovány s 10 nM anti-FAP polymerem v TBS s 0,1% Tween 20 (TBST, 1 hod při pokojové teplotě). Následně byl nenavázaný polymer odmyt TBST' (3×200 µl) a do jamek byl přidán konjugát NeutrAvidin-HRP (50 ng/jamku; Thermo Scientific; 30 min při pokojové teplotě). Na závěr byly jamky promyty TBST' (5×200 µl) a po přidání 180 µl chemiluminiscenčního substrátu (100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 2,5 mM luminol; 2 mM 4-jodofenol; 0,02% H₂O₂) byl signál bezprostředně poté detekován spektrofotometricky přístrojem Tecan Infinite M1000 PRO. Každý vzorek byl měřen v triplicátu. Limit detekce metody byl stanoven jako aritmetický průměr signálů pozadí zvětšený o pětinasobek jeho standardní odchylky (určeno z hexaplikátu tohoto vzorku).

4.11 Western blot pro detekci FAP

Vzorky rekombinantního FAP a lyzáty z U251_FAP+ buněk pro SDS-PAGE byly smíchány s neredukujícím vzorkovým pufrům pro SDS-PAGE (bez denaturace zvýšenou teplotou). Následně byly proteiny rozděleny pomocí SDS-PAGE (200 V, 80 min) a přeneseny na nitrocelulosovou membránu (1 hod, 100 V, v průběhu chlazení). Povrch membrány byl poté zablokován 0,55% (w/v) kaseinem v PBS (Casein buffer 20X-4X Concentrate, SDT; 1 h při pokojové teplotě). Membrána byla inkubována s 10 nM anti-FAP polymerem v TBST obsahujícím 0,055% (w/v) kasein (1 hod při pokojové teplotě). Dále byla membrána promyta PBST' (3×5 min) a poté inkubována s IRDye® 800CW Streptavidin konjugátem (LI-COR Biosciences) v PBS s 0,1% (w/v) Tween 20 (ředění 1:15 000, 1 hod při pokojové teplotě). Nenavázaný konjugát streptavidinu byl odmyt PBST' (3×5 min) a FAP byl vizualizován pomocí přístroje Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR).

Složení neredukujícího vzorkového pufru (4×): 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 40% (v/v) glycerol; 4% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); 0,012% (w/v) bromfenolová modř

Složení přenosového pufru: 192 mM glycin; 25 mM Tris-HCl; 10% (v/v) methanol; 0,1% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS); pH neupravováno

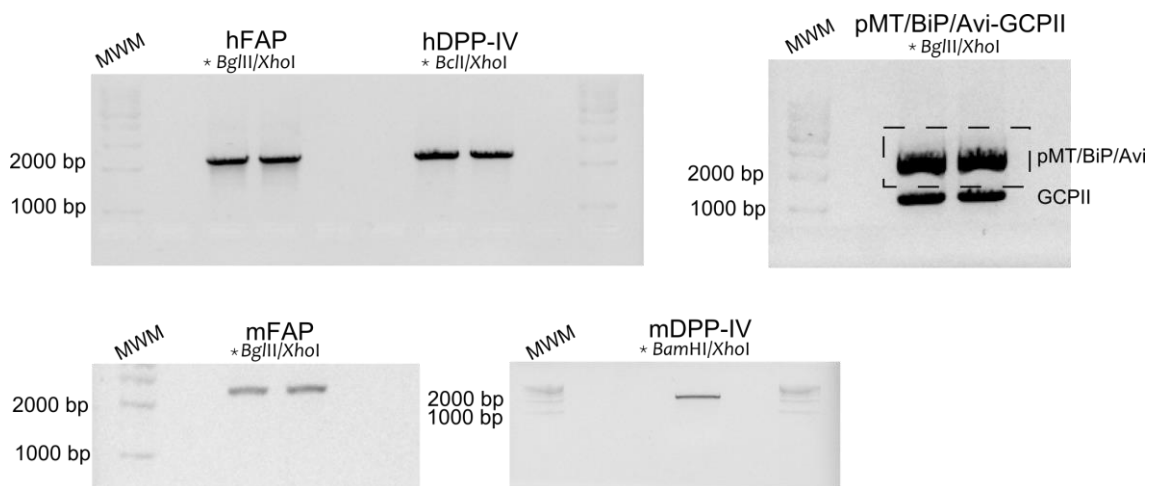
4.12 Selektivní zabíjení buněk pomocí cytotoxického anti-FAP konjugátu

Buňky U251_FAP+ (exprimující FAP) a U251 (netransfekované FAP) byly naředěny v DMEM médiu s 10% FBS, 4 mM L-glutaminem a 100 nM doxycyklinem (pouze pro U251_FAP+) a přidány do 96jamkové transparentní destičky tak, aby v každé jamce bylo 1500 buněk. Takto připravené byly buňky ponechány do dalšího dne. K buňkám bylo druhý den přidáno 10 μ l koncentrační řady anti-FAP polymeru obsahujícího inhibitor FAP a cytotoxický ligand DM1 (anti-FAP-DM1 konjugát). Buňky byly v přítomnosti polymeru inkubovány 2 hod v 37 °C. Následně bylo stávající médium odsáto, buňky byly promyty 100 μ l média a poté k nim bylo přidáno 100 μ l nového média. Takto byly buňky ponechány 5 dní v 37 °C. Pátý den bylo k buňkám přidáno 50 μ l roztoku činidla pro stanovení viability buněk (The Cell Proliferation Kit II, Roche) a po inkubaci 4 hod v 37 °C byla změřena absorbance přístrojem Tecan Infinite M1000 PRO. Tento komerční kit funguje na principu metabolické přeměny barevného substrátu a jeho následného spektrofotometrického stanovení. V živých buňkách dochází sukcinát-tetrazolium reduktasovým systémem (součástí dýchacího řetězce v mitochondriích) k přeměně tetrazoliové soli (světle červená barva) na formazan (temně červená barva), který je následně měřen spektrofotometricky. Každá z přidávaných koncentrací anti-FAP-DM1 konjugátu byla měřena v tetraplikátu. Měření proběhlo nezávisle na sobě čtyřikrát a z každého experimentu byla určena hodnota EC50 konjugátu pro U251_FAP+ a U251. Z těchto čtyř hodnot byl poté vypočítán aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

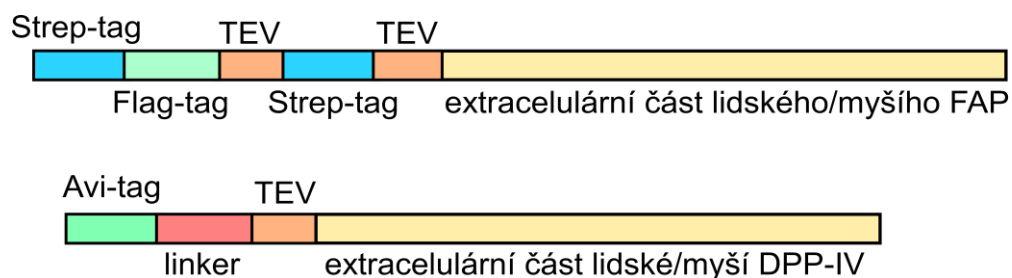
5 Výsledky

5.1 Klonování, exprese a purifikace rekombinantních proteinů FAP a DPP-IV

Pro přípravu extracelulární části lidského a myšního FAP byl použit plasmid obsahující kombinaci Strep-tag a Flag-tag (SF-FAP), pro přípravu extracelulární části lidské a myšší DPP-IV plasmid obsahující Avi-tag (Avi-DPP-IV) (Obr. 11). DNA kódující extracelulární části FAP a DPP-IV pro vložení do plasmidů byla získána amplifikací sekvence z plasmidů pTRE-Tight_hFAP (pro lidský FAP), pTRE-Tight_hDPP-IV (pro lidskou DPP-IV), v případě myších variant z myšší cDNA získané z dělohy (v případě FAP) a ze srdce (v případě DPP-IV) (Obr. 10).

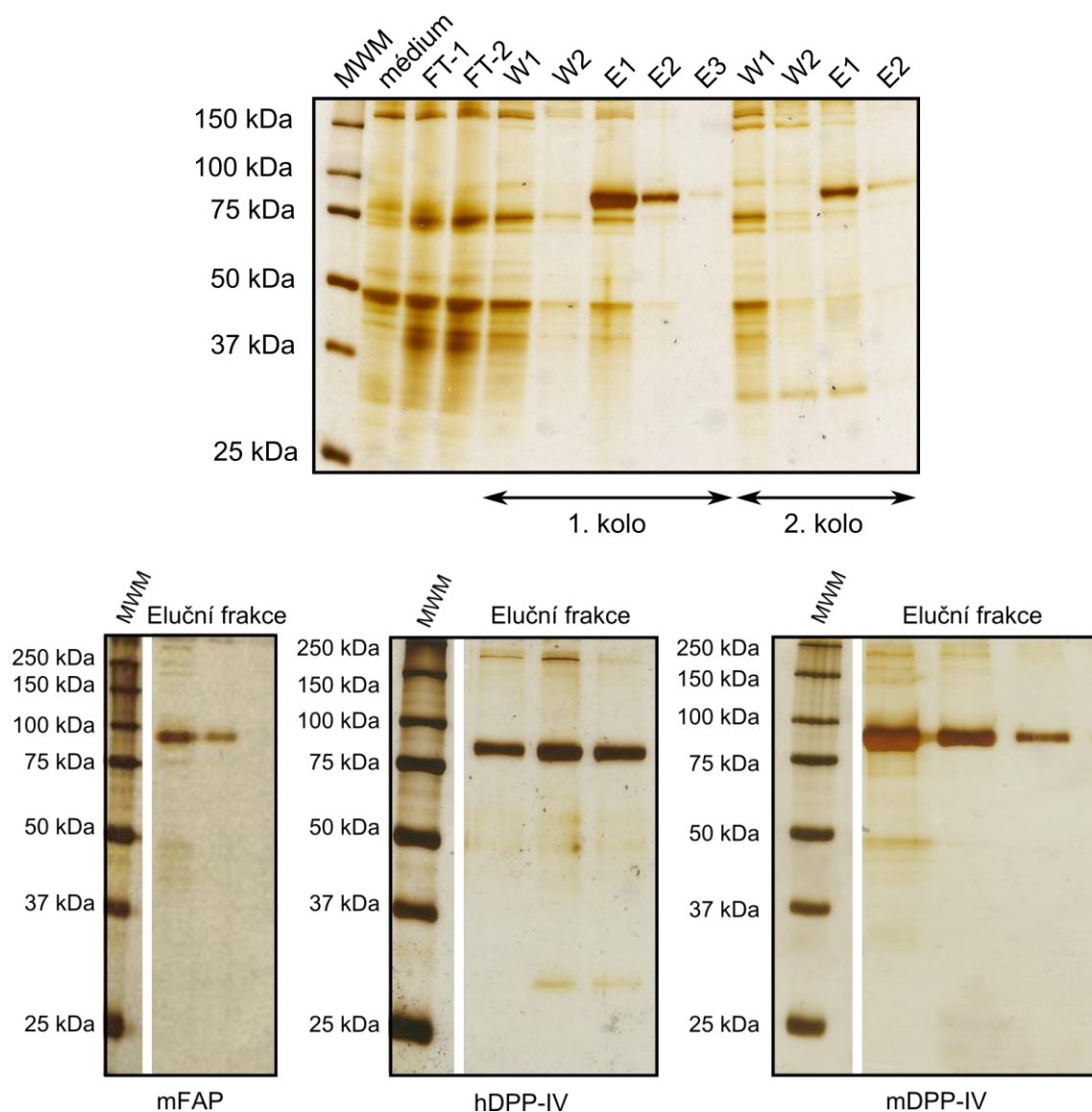


Obr. 10: Amplifikovaná DNA kódující extracelulární části myších a lidských variant FAP a DPP-IV získaná pomocí PCR, po následném restričním štěpení příslušnými restričními endonukleasami. Plasmid obsahující Avi-tag (pMT/BiP/Avi-GCPII) pro vložení sekvence DPP-IV byl rozštěpen (pravý horní gel), plasmid obsahující Strep-tag a Flag-tag (pMT/BiP/SF-PSMA) pro vložení sekvence FAP jsem získala již rozštěpený. MWM – DNA marker molekulových hmotností (Qiagen).



Obr. 11: Konstrukty FAP a DPP-IV pro expresi v *Drosophila* S2 buňkách. FAP byl připraven se dvěma Strep-tagy pro purifikaci přes Strep-Tactin (modře) a Flag-tagem (zeleně) na N-konci, DPP-IV s Avi-tagem pro purifikaci přes Streptavidin Mutein (zeleně) rovněž na N-konci proteinu. Oba konstrukty obsahují štěpné místo pro proteasu TEV (viru tabákové mozaiky; oranžově) pro případné odstranění tagů. Červeně je zobrazen krátký linker oddělující Avi-tag a štěpné místo.

Všechny čtyři typy konstruktů byly exprimovány v *Drosophila* S2 buňkách podle již dříve publikovaného protokolu (Tykvart et al., 2012). Exprimované proteiny nesoucí na N-koncích odštěpitelné purifikační značky byly následně přes tyto značky z média purifikovány s využitím afinitní chromatografie – v případě SF-FAP pomocí nosiče Strep-Tactin, v případě Avi-DPP-IV pomocí nosiče Streptavidin Mutein matrix (Barinka et al., 2016; Tykvart et al., 2012). Nejprve byly všechny čtyři konstrukty připraveny s Avi-tagem na N-konci. Nicméně nízké výtěžky purifikace vedly v případě FAP k použití plasmidu nesoucího dva Strep-tagy a Flag-tag. Zatímco získaný výtěžek Avi-tagované DPP-IV (0,1 mg pro lidskou DPP-IV a 0,2 mg pro myší DPP-IV z 1 L zakoncentrovaného média) byl dostatečný pro biochemickou charakterizaci a otestování inhibičních schopností inhibitorů a polymeru, pro další použití FAP v jiných biochemických metodách (SPR, ELISA) byl připraven Strep-Flag-FAP (SF-FAP) konstrukt s následnými výtěžky 0,7 mg pro lidský a 0,2 mg pro myší FAP z 1 L zakoncentrovaného média. Jednotlivé frakce z průběhu purifikace byly denaturovány ve vzorkovém pufru, nanесeny na akrylamidový gel a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Proteiny na gelu byly poté vizualizovány barvením stříbrem (Obr. 12).



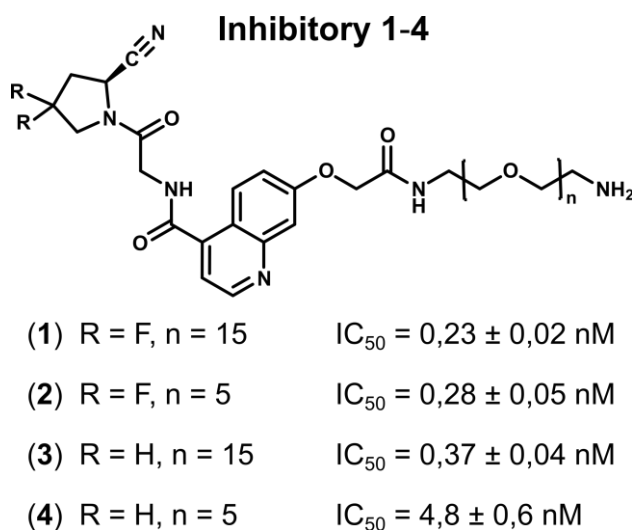
Obr. 12: Stříbrem barvený rezevizní gel zobrazující průběh purifikace rekombinantního lidského FAP (horní gel). Jednotlivé frakce reprezentují průběh purifikace – zleva: MWM – marker molekulových hmotností, médium – koncentrované médium z *Drosophila* S2 buněk, FT – proteklá frakce (FT-1 z 1. kola purifikace, FT-2 z 2. kola purifikace), W1-2 – promývací frakce, E1-E3 – eluční frakce. Na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorků, s výjimkou frakcí média, FT-1, FT-2 (0,5 μ l). Proužek migrující mezi velikostmi 75 a 100 kDa odpovídá purifikovanému SF-FAP. Dolní tři gely barvené stříbrem ukazují eluční frakce dalších purifikovaných rekombinantních proteinů – myši SF-mFAP, lidská Avi-hDPP-IV, myši Avi-mDPP-IV.

5.2 Výběr inhibitoru FAP a charakterizace vazby anti-FAP konjugátu

5.2.1 Stanovení inhibičních schopností připravených inhibitorů FAP

Pro otestování a výběr inhibitoru FAP pro jeho následné napojení k polymeru HPMA byl Dr. Jiřím Schimerem (ÚOCHB AV ČR) připraven panel inhibitorů s různou kombinací délky polyethylenglykolového (PEG) linkeru a modifikace prolinu (či bez modifikace) ve struktuře inhibitoru. Tím vznikly čtyři různé inhibitory zobrazené níže (Obr. 13), vycházející z již dříve popsané struktury inhibitoru založené na (4-chinolinoyl)glycyl-2-kyanopyrrolidinu.

Pro tyto inhibitory byly pomocí inhibice enzymové aktivity stanoveny inhibiční konstanty IC_{50} pro lidský a myší FAP. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky s využitím fluorogenního substrátu specifického pro FAP. Tři ze čtyř inhibitorů vykazovaly velmi podobnou schopnost inhibice (0,2; 0,3 a 0,4 nM), pouze inhibitor č. 4 měl schopnost inhibice o řád horší (5 nM; Obr. 12). Pro připojení na kopolymer HPMA a vytvoření polymerního konjugátu, tedy polymerního protilátkového mimetika, jsme vybrali inhibitor č. 1 se dvěma fluory a delším linkerem obsahující 15 polyethylenglykolových (PEG_{15}) jednotek.



Obr. 13: Struktury a charakterizace připravených inhibitorů FAP s různou délkou linkerů a s modifikací či bez modifikace prolinu. Pro inhibitory byly pomocí inhibice enzymové kinetiky stanoveny hodnoty inhibičních konstanty IC_{50} pro lidský FAP, které jsou prezentovány jako aritmetický průměr změřených hodnot \pm standardní odchylka.

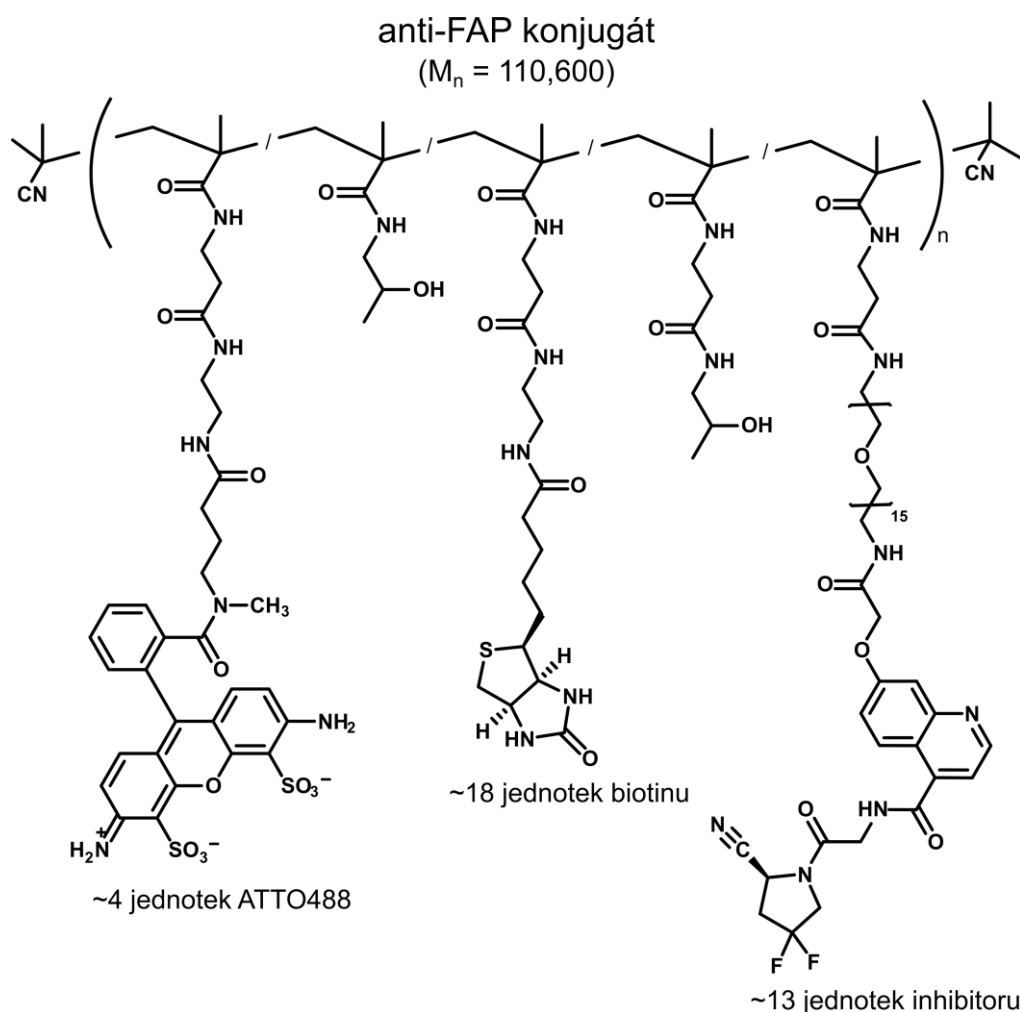
Pro určení selektivity inhibitoru č. 1 vůči FAP byly určeny jeho inhibiční konstanty i pro DPP-IV (tj. blízký homolog FAP), a to spektrofotometricky za použití

fluorogenního substrátu Gly-Pro-AMC, v obdobných reakčních podmínkách jako pro FAP. Hodnoty IC_{50} inhibitoru pro lidskou i myší DPP-IV byly o více než tři řády vyšší než pro FAP (Tab. 10), což zajišťuje dostatečnou selektivitu mezi těmito dvěma příbuznými enzymy.

Tab. 10: Naměřené hodnoty IC_{50} inhibitoru č. 1 (PEG_{15} , dva fluory) a anti-FAP konjugátu pro lidské i myší varianty rekombinantních enzymů FAP a DPP-IV.

Enzym	Inhibitor 1 [nM]	anti-FAP konjugát [nM]
lidský FAP	$0,23 \pm 0,02$	$1,1 \pm 0,3$
myší FAP	$0,31 \pm 0,06$	$3,0 \pm 0,2$
lidská DPP-IV	> 7000	> 10000
myší DPP-IV	> 7000	> 10000

Vybraný inhibitor č. 1 byl následně Dr. Vladimírem Šubrem (Ústav makromolekulární chemie AV ČR), konjugován společně s fluoroforem ATTO488 a biotinem ke kopolymeru HPMA. Tímto způsobem vznikl kompletní polymerní konjugát jako nástroj cílící na FAP, připravený k otestování v daných biochemických metodách (Obr. 14). Připojení inhibitoru ke kopolymeru HPMA vedlo ke zvýšení IC_{50} z 0,2 na 1,1 nM. Nicméně polymer si zachoval selektivitu vůči DPP-IV s naměřenou hodnotou IC_{50} vyšší o čtyři řády ($IC_{50} > 10 \mu M$) (Tab. 1).

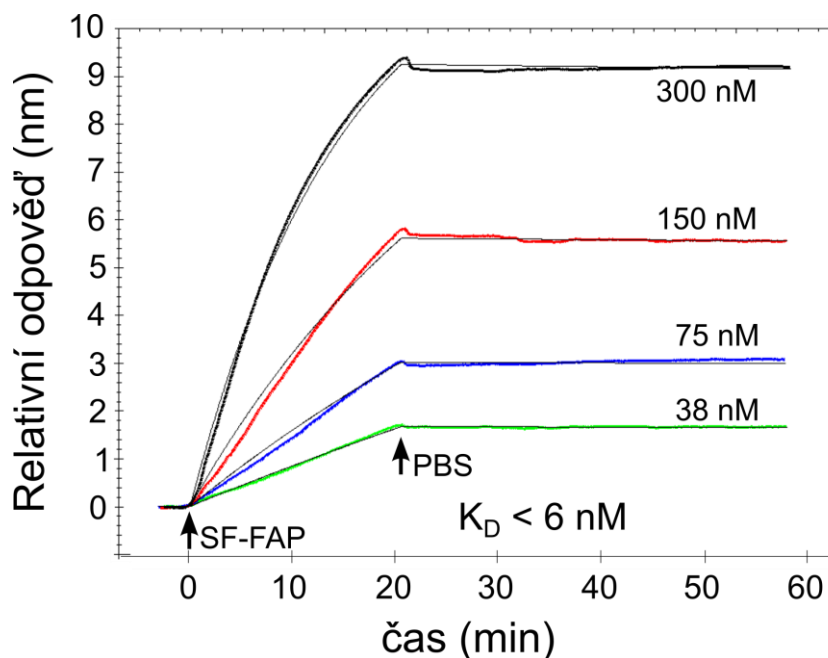


Obr. 14: Struktura připraveného anti-FAP polymerního konjugátu (tj. polymerního protilátkového mimetika, iBody). Cílení celého konjugátu na FAP je zajištěno prostřednictvím specifického inhibitoru FAP (~ 13 jednotek v molekule konjugátu), ATTO488 slouží k vizualizaci konjugátu (~ 4 jednotky) a biotin jako kotva pro imobilizaci konjugátu (~ 18 jednotek).

5.2.2 Stanovení disociační konstanty K_D anti-FAP konjugátu pomocí SPR

Pro charakterizaci a stanovení disociační konstanty polymerního konjugátu k FAP byla použita povrchová plasmonová resonance (SPR), fyzikálně-optická metoda sloužící k měření interakcí molekul v reálném čase a umožňující stanovit nejen finální disociační konstantu (K_D), ale i její jednotlivé složky – asociační rychlost k_{on} a disociační rychlost k_{off} . Na vrstvu neutravidinu, kovalentně vázaného na zlatý čip, byl imobilizován polymerní konjugát interakcí přes biotin. Na takto připravenou vrstvu byl vázán lidský rekombinantní FAP (SF-FAP) ve čtyřech koncentracích (Obr. 15). Z tvaru vazebné

křivky byla pomocí softwaru TraceDrawer v.1.5 (Ridgeview Instruments AB) stanovena asociační rychlost $k_{on} = 3860 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a disociační rychlost $k_{off} < 2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, která byla pod detekčním limitem přístroje. Z poměru těchto rychlostí byla vypočítána disociační konstanta $K_D < 6 \text{ nM}$.



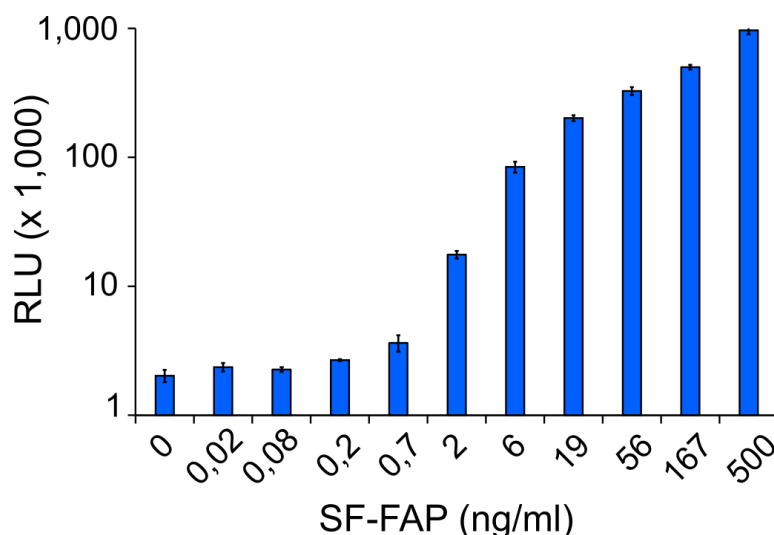
Obr. 15: Stanovení disociační konstanty (K_D) polymerního konjugátu pomocí povrchové plasmonové resonance. Na vrstvu neutravidinu byl imobilizován polymerní konjugát v koncentraci 500 nM a následně byl vázán rekombinantní lidský FAP (SF-FAP) ve čtyřech koncentracích (čas 0 min). Poté byla navázaná vrstva promývána PBS po dobu 30 min pro sledování disociace proteinu. Z poměru k_{off} a k_{on} bylo vypočteno $K_D < 6 \text{ nM}$.

5.3 Použití anti-FAP konjugátu pro detekci a izolaci FAP *in vitro*

5.3.1 Použití anti-FAP konjugátu pro detekci FAP v metodě ELISA

Polymerní konjugát byl použit v metodě ELISA, kde slouží jako detekční molekula pro FAP namísto detekční protilátky. V jamkách 96jamkové destičky se záchytovou specifickou monoklonální protilátkou F-19 proti FAP byl inkubován lidský rekombinantní FAP (SF-FAP) v koncentracích od 0,02 ng/ml po 500 ng/ml. Pro detekci byl následně použit polymerní konjugát v koncentraci 10 nM, následovaný inkubací s konjugátem neutravidinu a křenové peroxidasy, který váže polymer interakcí

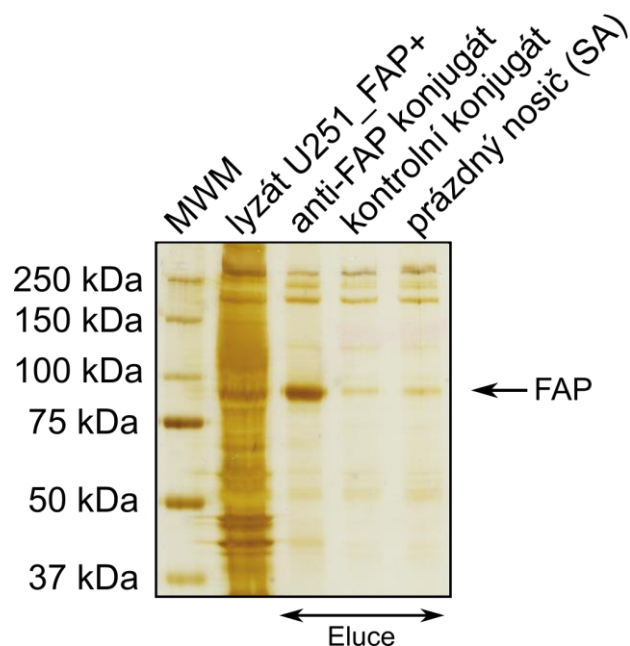
s biotinem. Detekční limit, stanovený jako součet aritmetického průměru šesti stanovení signálu pozadí a jeho pěti standardních odchylek, byl 0,4 ng/ml FAP (Obr. 16).



Obr. 16: Použití polymerního konjugátu pro detekci a kvantifikaci FAP metodou ELISA. Jako záchytová protilátka byla použita monoklonální protilátka F-19 proti FAP a polymerní konjugát sloužil jako detekční molekula. Relativní luminiscenční signál (RLU) narůstá se zvyšujícím se množstvím rekombinantního FAP, hodnoty jsou zobrazeny jako aritmetický průměr z trojho měření \pm standardní odchylka.

5.3.2 Použití anti-FAP konjugátu pro afinitní izolaci FAP z buněčného lyzátu

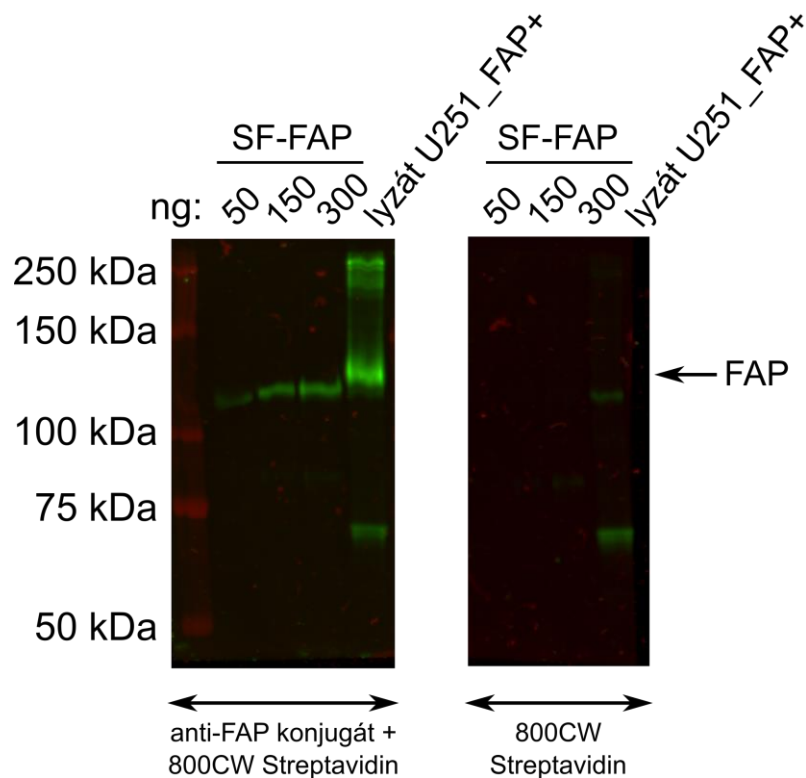
Použitím konjugátu pro afinitní izolaci FAP jsme chtěli ověřit, zda lze FAP specificky a účinně separovat ze směsi proteinů buněčného lyzátu. Nejprve byl konjugát prostřednictvím biotinu navázán na nosič (pokrytý streptavidinem). Analogicky byl navázán i kontrolní konjugát bez inhibitoru FAP (pro určení potenciální nespecifické vazby konjugátu); jako další negativní kontrola byl použit pouze samotný nosič (pro určení potenciální nespecifické vazby samotného nosiče). Po inkubaci vzorků s lyzátem buněk U251 stabilně transfekovaných FAP byl nosič promyt a konjugát (s potenciálně navázaným FAP) byl eluován z nosiče. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Jak je patrné z Obr. 7, konjugát anti-FAP účinně izoloval FAP ze směsi proteinů, zároveň vykazoval minimální nespecifickou vazbu. Zároveň byl v elucích negativních kontrol (konjugát bez inhibitoru, či samotný nosič) FAP slabě detekován (Obr. 17).



Obr. 17: Afinitní izolace FAP ze směsi proteinů buněčného lyzátu pomocí konjugátu anti-FAP. Vzorek lyzát U251_FAP+ reprezentuje buněčný lyzát inkubovaný s anti-FAP konjugátem. Kontrolní konjugát představuje konjugát bez inhibitoru FAP, prázdný nosič pak reprezentuje prázdný streptavidinový nosič.

5.3.3 Použití anti-FAP konjugátu pro detekci FAP pomocí Western blotu

Připravený konjugát jako detekční nástroj byl také vyzkoušen v „semi-nativním“ provedení Western blotu. Rekombinantní lidský FAP (SF-FAP) a lyzát buněk U251 transfekovaných FAP byly před nanesením na gel pouze smíchány s SDS vzorkovým puftrem a dále nedenedurovány zahřátím. FAP byl na membráně vizualizován pomocí 10 nM anti-FAP konjugátu a jako proužek migrující okolo velikosti 130 kDa. Detekční limit v tomto uspořádání byl 50 ng FAP (Obr. 18).



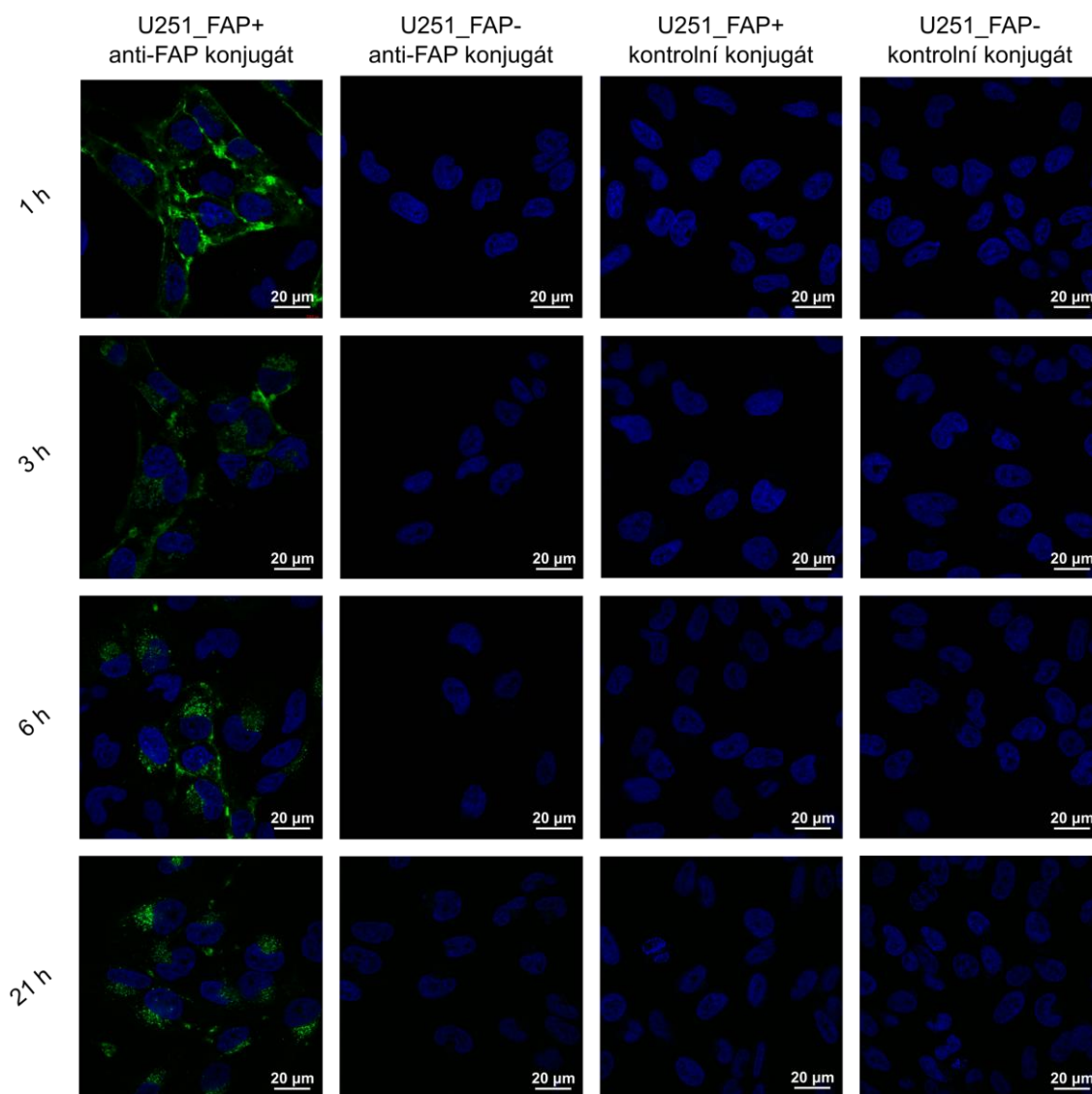
Obr. 18: Detekce FAP polymerním konjugátem anti-FAP „semi-nativní“ metodou Western blot. Po inkubaci nitrocelulosoové membrány s anti-FAP polymerem a následně se streptavidinem konjugovaným s fluoroforem 800CW („streptavidin-800CW“) byl detekován jak rekombinantní FAP (SF-FAP), tak FAP v buněčném lyzátu (lyzát U251_FAP+). Membrána vpravo zobrazuje nespecifický signál po vazbě samotného streptavidin-800CW.

5.4 Použití anti-FAP konjugátu pro detekci FAP v buněčných experimentech

5.4.1 Vizualizace FAP na buňkách pomocí konfokální mikroskopie

Po úspěšném otestování vazby a selektivity konjugátu anti-FAP v *in vitro* metodách byly jeho vlastnosti otestovány i na buňkách U251 stabilně transfekovanými FAP (U251_FAP+ jako buňky exprimující FAP a U251_FAP- jako buňky neexprimující FAP). Oba typy buněk byly inkubovány s 200 nM polymerem obsahujícím inhibitor FAP. Jako negativní kontrola byl ve stejné koncentraci použit polymer neobsahující inhibitor. Konfokální mikroskopie ukázala výrazné pozitivní barvení, tedy vazbu konjugátu anti-FAP pouze na buňky exprimující FAP (U251_FAP+), zatímco na buňkách neexprimujících FAP a na obou typech buněk inkubovaných s negativním polymerem (neobsahujícím inhibitor) nebyl pozorován fluorescenční signál (Obr. 19). Po vazbě

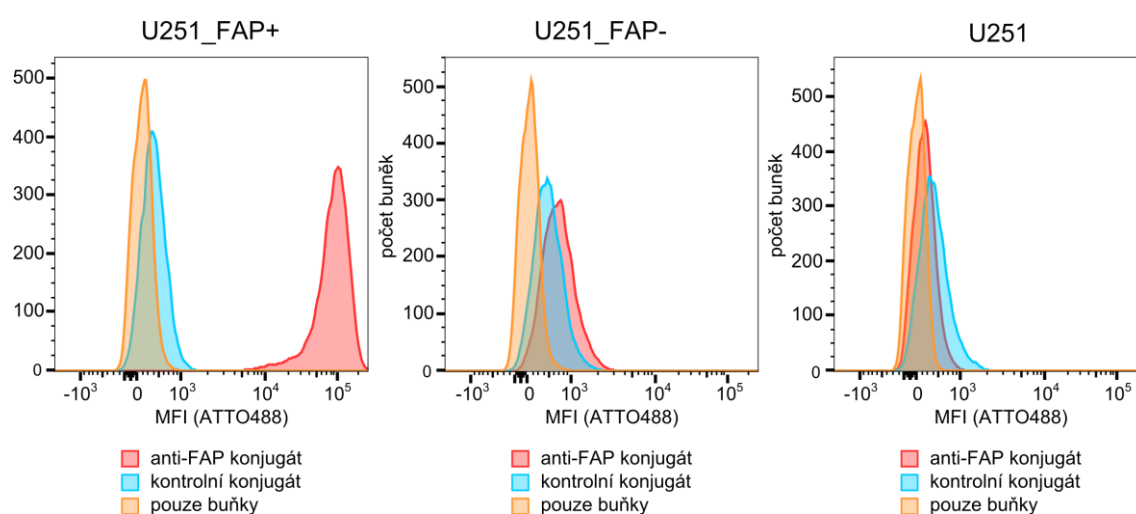
konjugátu na buňky U251_FAP+ docházelo k internalizaci konjugátu, kdy byla patrna nejprve výrazná membránová pozitivita (1 hod), v dalších časech (3, 6, 21 hod) dochází k postupné internalizaci polymeru a kumulaci signálu uvnitř buněk (Obr. 19).



Obr. 19: Vizualizace FAP na buňkách pomocí konfokální mikroskopie. Buňky exprimující FAP (U251_FAP+) a neexprimující FAP (U251_FAP-) byly inkubovány s anti-FAP konjugátem nesoucím inhibitor FAP a kontrolním konjugátem bez inhibitoru. Zelený fluorescenční signál značí vazbu polymeru na buňky (fluorofor ATTO488), modře jsou obarvena jádra buněk (Hoechst 34580).

5.4.2 Detekce FAP na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie

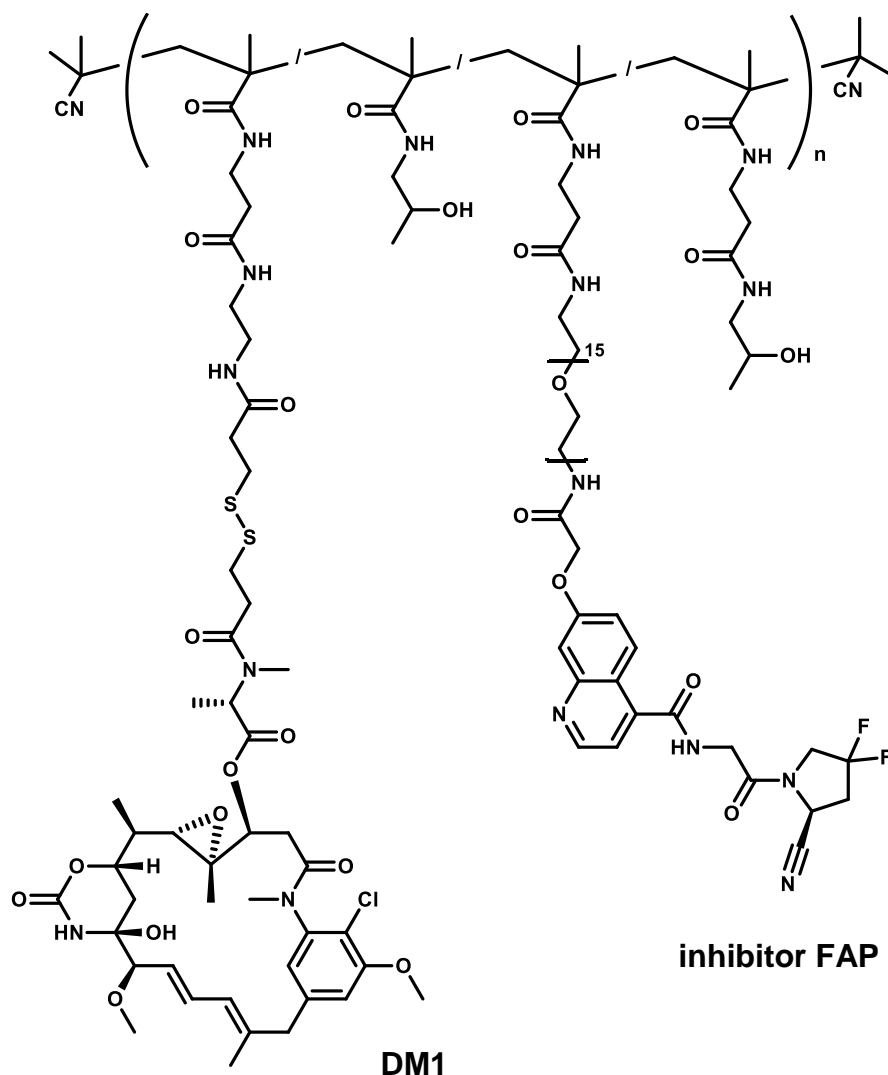
Pro ověření výsledků z konfokální mikroskopie byl proveden obdobný experiment s využitím průtokové cytometrie. V experimentu byly použity tři typy buněk – U251_FAP+ (s indukovanou expresí FAP doxycyklinem), U251_FAP- (s vypnutou expresí FAP; viz kapitola 4.3) a U251 (čistá linie netransfekovaná FAP). Cytometrie potvrdila výsledky z konfokální mikroskopie, kdy silné pozitivní barvení bylo přítomno pouze v případě U251_FAP+ buněk inkubovaných s cílícím konjugátem anti-FAP obsahujícím inhibitor FAP. Z výsledků je patrné, že buňky U251_FAP- vykazují mírnou vazbu anti-FAP konjugátu a naopak buňky netransfekované FAP (čistá buněčná linie U251) tento konjugát neváží (Obr. 20).



Obr. 20: Analýza vazby anti-FAP konjugátu na buňky exprimující FAP pomocí průtokové cytometrie. Buňky U251, U251_FAP+, U251_FAP- byly inkubovány s 200 nM polymery (anti-FAP konjugát obsahující inhibitor FAP, kontrolní polymer bez inhibitoru FAP).

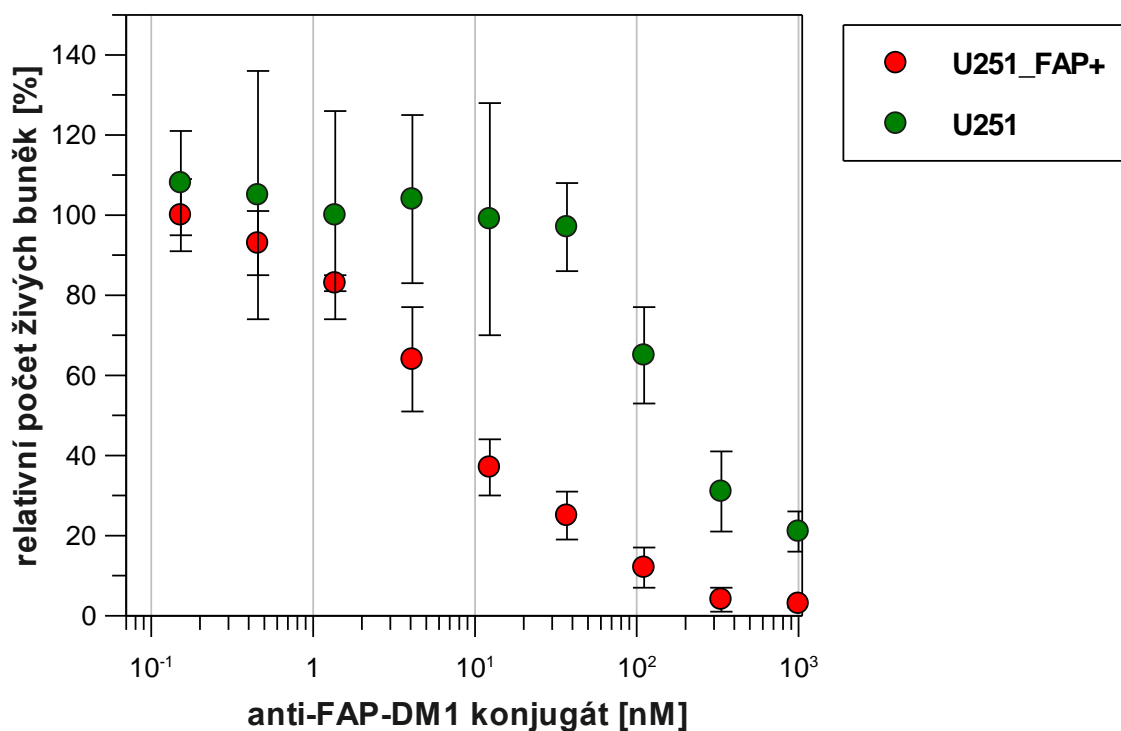
5.5 Selektivní zabíjení buněk pomocí cytotoxického anti-FAP konjugátu

V experimentu byly použity buňky U251_FAP+ (exprimující FAP) a U251 (netransfekované FAP). Buňky byly inkubovány s koncentrační řadou cytotoxického konjugátu obsahujícím inhibitor FAP a cytotoxickou molekulu DM1, inhibitor tubulinu (Remillard et al., 1975) (Obr. 21). Konjugát byl připraven na UMCH AV ČR.



Obr. 21: Struktura anti-FAP-DM1 konjugátu použitého při selektivním zabíjení buněk exprimujících FAP. Konjugát obsahuje cytotoxickou molekulu DM1 a inhibitor FAP.

Účinek selektivního zabíjení buněk byl stanoven pomocí komerčního kitu k měření viability buněk, založeném na metabolické přeměně substrátu živými buňkami a jeho následném spektrofotometrickém stanovení. Ze sigmoidní křivky relativního počtu živých buněk (Obr. 22) byla určena EC_{50} konjugátu pro oba typy buněk, kdy finální hodnota pro byla vypočítána jako aritmetický průměr ze čtyř nezávislých měření.



Obr. 22 : Reprezentativní graf závislosti relativní počtu živých buněk na dané koncentraci anti-FAP-DM1 konjugátu. Barevně jsou odlišené oba typy buněk, které byly v experimentu použity. Hodnoty jsou zobrazeny jako aritmetický průměr z měření tetraplikátu pro každou z použitých koncentrací konjugátu \pm standardní odchylka.

Změřená hodnota EC_{50} cytotoxického anti-FAP konjugátu pro buňky U251_FAP+ pak byla $EC_{50} = 6$ nM, pro buňky U251 pak 140 nM. (Tab. 11).

Tab. 11: Stanovené hodnoty EC_{50} anti-FAP-DM1 konjugátu. Hodnoty EC_{50} anti-FAP-DM1 konjugátu byly stanoveny pro buňky U251_FAP+ a U251. Finální hodnoty EC_{50} jsou prezentovány jako aritmetický průměr čtyř nezávislých měření \pm standardní odchylka.

EC_{50}	
buňky	anti-FAP-DM1 konjugát [nM]
U251_FAP+	6 ± 3
U251	140 ± 50

6 Diskuse

Proteasy jsou pro svou roli v onkologických onemocněních studovány s cílem vyvíjet prostředky, jak inhibovat jejich proteolytickou aktivitu nebo jak je využít pro doručování léčiv do nádorů (Sevenich and Joyce, 2014; Vandooren et al., 2016). Pro oba z těchto důvodů je nutné vyvíjet specificky cílící molekuly. Protože je role proteas a jejich homologů natolik spletita a jejich funkce i ve fyziologických procesech natolik různorodá, jsou známy případy, kdy právě kvůli nedostatečné selektivitě inhibitorů došlo k jejich selhání v klinických testech a k neočekávaným patologickým projevům u pacientů (Hutchinson et al., 1998).

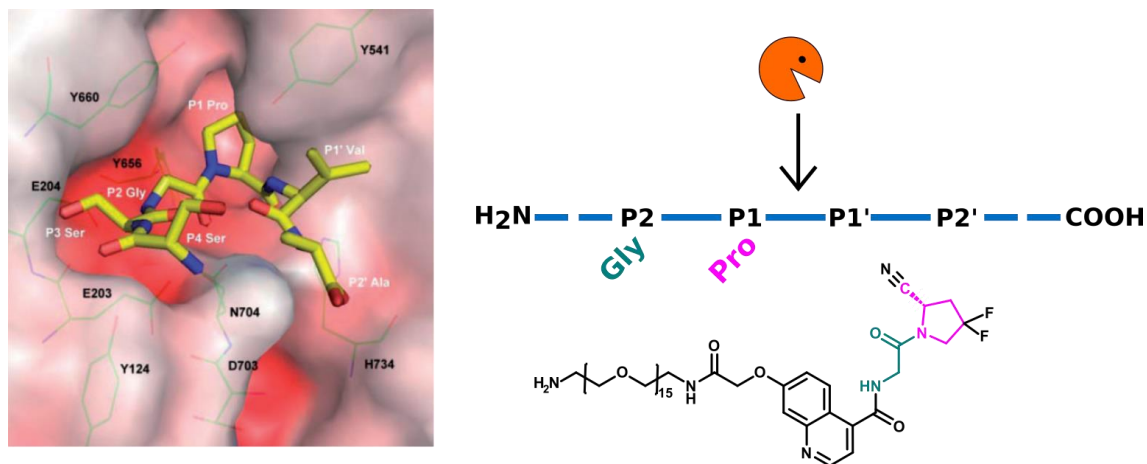
Fibroblastový aktivační protein (FAP) je díky své expresi omezené většinou pouze na patologickou tkáň (Garin-Chesa et al., 1990) slibným cílem protinádorové léčby. Pro jeho homologii s dipeptidylpeptidasou IV (DPP-IV), exprimovanou téměř ve všech zdravých tkáních (Dinjens et al., 1989), je i v tomto případě zásadní selektivita vyvíjených inhibitorů či jiných cílících prostředků. Ve prospěch FAP jako protinádorového cíle také hraje skutečnost, že je často exprimován ve fibroblastech nádorového stromatu (Garin-Chesa et al., 1990), protože se současná protinádorová léčba zaměřuje nejen na vlastní nádorové buňky, ale také na buňky okolní, napomáhající progresi nádoru. Literatura popisuje, že jedním z možných důvodů, proč současná léčba chemoterapií nebo léčba cílená na nádorové buňky nefunguje dostatečně, je přítomnost stromálních buněk, které jsou často k chemoterapii rezistentní a mohou svým působením podporovat odolnost a následné znovuoobnovení růstu nádoru po terapii (shrnutí ve Velaei et al., 2016). I proto se v případě FAP kombinuje léčba nádorů obvyklými postupy s cílením nádorových fibroblastů pozitivních na FAP. Prohovoří také studie, kdy za použití anti-FAP DNA vakcíny, která v prostředí nádoru aktivovala CD8⁺ T lymfocyty proti stromálním buňkám FAP, a v kombinaci s doxorubicinem (chemoterapeutikum), došlo k inhibici růstu nádoru a u poloviny myši dokonce k úplnému vymizení nádoru a prodloužení jejich života, čehož nebylo dosaženo při uplatnění jen jednoho z obou popsaných přístupů (Loeffler et al., 2006). Nedávná publikace také ukazuje důležitost a efektivitu kombinace imunoterapie cílené na nádorové buňky s DNA vakcínou zasahující stromální buňky exprimující FAP (Duperret et al., 2018). Dalším důkazem propojení přístupů cílené léčby na vlastní nádorovou tkáň a okolní nádorové mikroprostředí jsou probíhající klinické studie, kombinující imunoterapeutický zásah nádorových fibroblastů

s expresí FAP a cílení markerů nádorových buněk již známými postupy (ClinicalTrials.gov, identifikátory studií: NCT02627274, NCT03063762).

V této diplomové práci popisují nový nástroj pro cílení FAP – polymerní konjugát, specificky vážící FAP a buňky exprimující FAP a schopný nahradit protilátky v biochemických metodách. Dle výsledků z inhibičních měření anti-FAP konjugátu je inhibiční konstanta (IC_{50}) pro rekombinantní DPP-IV o více než tři řády vyšší, což zajišťuje dostatečnou selektivitu pro FAP. Samotný inhibitor FAP s připojeným linkerem PEG₁₅ vykazuje inhibiční konstantu 200 pM a po jeho připojení na HPMa kopolymer došlo ke zvýšení inhibiční konstanty celého konjugátu (obsahujícího 13 jednotek inhibitoru) na 1,1 nM. To je překvapující výsledek, protože v první publikované práci o využití těchto polymerních konjugátů došlo k přesně opačnému efektu (Šácha et al., 2016). Polymerní konjugát byl nejprve popsán a otestován na glutamátcarboxypeptidase II (GPCII; z angl. glutamate carboxypeptidase II) (Šácha et al., 2016). Po připojení specifického inhibitoru GCP II ($K_i = 2$ nM) na HPMa kopolymer, došlo k výraznému snížení inhibiční konstanty na 4 pM. Toto pozorování by se dalo vysvětlit synergickým efektem několika molekul inhibitoru (19 jednotek) na jednom polymeru. Vzhledem k tomu, že oba enzymy, FAP i GCP II, mají velmi podobnou strukturní stavbu – transmembránový homodimer s rozsáhlou extracelulární částí (Aertgeerts et al., 2005; Mesters et al., 2006), byl výsledek nárůstu IC_{50} v případě FAP do jisté míry nečekaný. Vysvětlení by mohly do jisté míry podat konstanty asociační rychlosti k_{on} a disociační rychlosti k_{off} konjugátů. Povrchová plasmonová resonance (SPR) ukázala, že anti-FAP konjugát má poměrně vysokou k_{on} a velmi nízké k_{off} . Naopak v případě GCP II je konstanta k_{on} extrémně vysoká a k_{off} také velmi nízká (Šácha et al., 2016). Z tvaru křivky SPR však nelze říct, zda dochází k asociaci a disociaci komplexu FAP a konjugátu nebo pouze k jednorázovému vytvoření stabilního komplexu, i když samotná vazba nitrilové skupiny inhibitoru na serin aktivního místa FAP je popisována jako reverzibilní (Jansen et al., 2014).

Další z možných hypotéz vysvětlující pozorované zvýšené IC_{50} anti-FAP konjugátu je způsob vedení PEG₁₅ linkeru ze struktury inhibitoru. Struktura inhibitoru FAP, který publikovali Jansen et al. v roce 2014, dovoluje vést PEG linker pouze jedním způsobem (z chinolinového zbytku), tedy ve směru za tzv. P2 pozici v substrátech pro FAP. FAP odštěpuje dipeptidy za prolinem v pozici P1, tj. štěpí vazbu P1-P1' (Edosada et al., 2006b). V publikaci, ve které autoři ukazují dokování substrátu do aktivního místa FAP (Huang et al., 2011a), je zobrazeno umístění glycinu (P2 a prolinu (P1), kde je

patrné, že je zde prostor také pro vedení substrátu či inhibitoru P1' a P2' místy (Obr. 23). Protože inhibitor použitý pro přípravu anti-FAP konjugátu umožňoval z chemického hlediska vedení linkeru pouze ve směru za P2 místo, mohla by syntéza nového typu inhibitoru, v jehož struktuře by bylo možné vést linker i směrem do P1'-P2' míst, přinést vysvětlení zvýšení inhibiční konstanty anti-FAP konjugátu oproti samotnému inhibitoru.



Obr. 23: Aktivní místo FAP s umístěným substrátem a zobrazenými tzv. P místy pro jednotlivé aminoskupiny v substrátech (vlevo). Struktura inhibitoru FAP v anti-FAP konjugátu obsahuje PEG₁₅ linker vedený ve směru od P1-P2 místa dále (vpravo). Z obrázku aktivního místa je vidět, že existuje prostor pro vedení substrátu (či inhibitoru) také P1', P2' místy (Huang et al., 2011a).

I přesto zůstává anti-FAP konjugát svou nanomolární afinitou více než dostačujícím nástrojem pro *in vitro* a *in vivo* cílení FAP. Co je navíc důležité, i přes zhoršenou afinitu inhibitoru po připojení na konjugát, zachoval si konjugát svou selektivitu vůči DPP-IV. Tím, že je ligandem inhibitor, dovoluje konjugát cílit na aktivní formu enzymu, protože pro svou vazbu potřebuje zachované aktivní místo.

Ve srovnání s protilátkami, které vážou povrchové epitopy svých ligandů, polymerní konjugáty (iBodies) jsou založeny na interakci inhibitoru a aktivního místa, což jsou konzervované části enzymu (Šácha et al., 2016). Proto na základě afinity anti-FAP konjugátu k myšímu ortologu (IC₅₀ = 3 nM) představuje anti-FAP konjugát nástroj také pro experimentální účely v myších modelech a pro preklinické studie.

Použitím anti-FAP konjugátu navázaného na agarosový nosič se streptavidinem (SA) byl metodou afinitní izolace („imunoprecipitace“) FAP specificky izolován ze směsi

proteinů. Jak je vidět na Obr. 17, spolu s FAP byly izolovány i některé další proteiny o vysoké molekulové hmotnosti. Tyto proteiny jsou na gelu viditelné i v kontrolních frakcích (konjugát bez inhibitoru, samotný nosič SA). Zřejmě tedy došlo k nespecifické vazbě právě na agarosový nosič a nikoliv na konjugát. Viditelné slabé proužky FAP i v těchto kontrolních frakcích mohou být způsobeny velkým množstvím FAP přítomným v lyzátu z transfekovaných buněk. Anti-FAP konjugát by tak mohl sloužit jako nástroj pro izolaci FAP a jeho detekci z nádorových či jiných patologických tkání a také z krevní plasmy, kde se nachází jeho rozpustná forma APCE (Lee et al., 2006).

Anti-FAP konjugát byl použit také v metodě ELISA pro detekci a kvantifikaci FAP. Bez hlubší optimalizace dosáhl limit detekce přibližně stejného množství FAP jako komerční dostupná varianta ELISA (Human FAP DuoSet ELISA DY3715: R&D Systems). Vzhledem k tomu, že role FAP získává stále větší pozornost také při studiu jiných onemocnění, než jsou nádorová, a že se často usuzuje na souvislost změny exprese FAP v těchto nemocech, jsou metody pro zjišťování hladin exprese často využívány. Protože solubilní FAP je přítomný v plasmě (Lee et al., 2006) a pro tuto formu byly nalezeny substráty, jejichž proteolytická inaktivace či degradace by mohla mít souvislost s onemocněními (Sánchez-Garrido et al., 2016; Willige et al., 2013; Zhen et al., 2016), je i metoda ELISA v těchto případech používána. Komerční ELISA byla využita při zjišťování množství FAP v plasmě u pacientů s jaterní cirhózou, kde medián koncentrace FAP u pacientů byl 166 ng/ml, zatímco u zdravých jedinců 107 ng/ml (Willige et al., 2013). Jelikož se hladiny FAP v krevní plasmě pohybují v množstvích desítek až stovek ng/ml, byla by ELISA vyvinutá s anti-FAP konjugátem pro tyto účely použitelná. Nedávná publikace používala komerčně dostupnou ELISA pro měření cirkulujícího FAP a současně aktivní metodou zjišťovala poměr jeho aktivní složky ve vzorcích pacientů s onemocněním jater a s ischemickou srdeční chorobou. Právě v těchto případech, kdy je pro měření zajímavá frakce aktivního enzymu, by vyvinutá ELISA založená na konjugátu obsahujícím inhibitor cílící aktivní místo FAP, mohla být také účelná (Uitte de Willige et al., 2017).

Další z metod, ve které se anti-FAP konjugát prokázal jako použitelný nástroj, je Western blot. Funkčnost konjugátu pro detekci FAP v tomto provedení byla překvapující, protože k tomu, aby mohl být FAP vizualizován, je nutné, aby byla zachována jeho nativní forma. SDS-PAGE a přenos na membránu v tomto provedení vede často k destabilizaci proteinu a porušení nativního stavu. V tomto případě k tomu však nedošlo a FAP byl detekován na membráně jako proužek velikostně okolo 130 kDa, odpovídající

zachované dimerní formě proteinu. Možnost amplifikace signálu konjugátu použitím širokého spektra dostupných fluoroforů se streptavidinem přes interakci s biotinem, vytváří z anti-FAP konjugátu nástroj aplikovatelný a optimalizovatelný na různé typy detekčních zařízení.

Poté co byl anti-FAP konjugát otestován na rekombinantním proteinu FAP, následovaly pokusy na živých buňkách exprimujících FAP. Konfokální mikroskopie prokázala selektivní vazbu konjugátu na buňky exprimující FAP, zatímco na buňkách neexprimujících FAP nebyl detekovaný signál z fluoroforu, ani při použité koncentraci 200 nM, což je 200krát nad inhibiční konstantou konjugátu k rekombinantnímu FAP. Protože jedna molekula konjugátu obsahuje 4 jednotky fluoroforu, poskytuje konjugát velmi vysoký signál na buňkách. Anti-FAP konjugát navíc umožňuje amplifikaci signálu přes interakci biotin-streptavidin, což by mohlo být výhodné pro použití na buňkách s nízkou expresí FAP. Konfokální mikroskopie buněk exprimujících FAP s pomocí fluorescenčního konjugátu ukázaly, že komplex navázaného konjugátu na FAP internalizuje, což implikuje použití anti-FAP konjugátu v cílené protinádorové léčbě.

Pro potvrzení výsledků z mikroskopie a pro citlivější detekci, byla vazba anti-FAP konjugátu na buňky otestována také pomocí průtokové cytometrie. Zde se již dříve ukázalo, že anti-FAP konjugát se v malé míře váže i na buňky s vypnutou expresí FAP (U251_FAP-). Tento efekt je zřejmě dán regulovatelným expresním systémem TetOn, který v přítomnosti doxycyklinu spouští expresi proteinu, zatímco v nepřítomnosti je exprese vypnutá (Gossen and Bujard, 1992). Za spouštění exprese u U251_FAP- buněk by mohl být zodpovědný tetracyklin přítomný ve fetálním bovinním séru (FBS), který umožní tetracyklinovému transaktivátorovému proteinu nasednout na promotor (diskutováno v manuálu prodejce FBS pro systém TetOn; Clontech, BD Biosciences). Z tohoto důvodu byly do experimentu přidány také buňky netransfekované FAP (U251). Právě tyto buňky prokázaly, že nespecifická vazba anti-FAP konjugátu na buňky je skutečně s největší pravděpodobností způsobena použitým inducibilním expresním systémem. Průtoková cytometrie mimo jiné ukázala i možnost vizualizace buněk transfekovaných myším FAP a co je důležité, také detekci endogenní exprese FAP, za použití amplifikačního kroku pomocí streptavidinu konjugovaného s fykoerythrinem (Dvořáková et al., 2017).

Z důvodu pozorování vazby konjugátu na buňky s vypnutou expresí FAP (U251_FAP-) byly pro další buněčný experiment vybrány U251 buňky netransfekované FAP namísto U251_FAP-. Na těchto buňkách byl testován cytotoxický anti-FAP

konjugát, obsahující inhibitor FAP a toxin DM1, který byl ke konjugátu připojen disulfidovou vazbou, protože základní struktura DM1 již obsahuje SH skupinu (Obr. 20). Tato disulfidová vazba by měla být po internalizaci konjugátu do buňky redukována redukčními systémy uvnitř buňky, a tím by mělo dojít k uvolnění toxinu DM1 (Chari et al., 1992). Z výsledků je patrné, že U251_FAP+ podléhá cytotoxickému efektu konjugátu výrazně více než buňky U251 (Obr. 22). Tyto prvotní experimenty ukazují existenci terapeutického okna mezi buňkami s expresí a bez exprese FAP, kdy hodnota EC_{50} pro buňky U251_FAP+ (exprimující FAP) byla 6 nM, zatímco pro buňky U251 (neexprimující FAP) 140 nM. Cytotoxický účinek na buňky U251 navíc nebyl pozorovatelný do přibližně desetinásobku hodnoty EC_{50} pro buňky U251_FAP+. Tyto výsledky poukazují na slibné budoucí využití konjugátu v pozdějších *in vivo* experimentech.

Selektivitu zabíjení buněk zajišťuje inhibitor FAP na konjugátu, a tak by mělo v ideálním případě docházet k cytotoxickému efektu pouze u buněk s expresí FAP. Při vysokých koncentracích konjugátu však umírají i buňky neexprimující FAP, na které by se cytotoxický konjugát neměl vázat (Obr. 22). Jedním z možných vysvětlení je, že se do buňky dostane nespecifickým způsobem sice jen malé množství konjugátu, které není pozorovatelné konfokální mikroskopií, ale přesto dostačující k projevu toxicity na buňkách. DM1 (mertansin) totiž patří mezi nejtoxičtější molekuly používané v cíleném doručování léčiv (Chari et al., 1992). Další možnou hypotézou je, že by příspěvkem některé ze složek média došlo k redukci disulfidové vazby a i přes oxidačně-redukční rovnováhu došlo k uvolnění DM1 a jeho volnému prostupu přes membránu do buňky. Uvolňování DM1 z konjugátu protilátky (proti GCPII) s DM1 bylo popsáno v klinické studii u pacientů s metastázami karcinomu prostaty (Milowsky et al., 2016).

Podobné výsledky prezentované v této práci ukázali také autoři publikace popisující konjugát protilátky proti FAP s DM1, který dosáhl v buněčných experimentech hodnoty $EC_{50} = 50$ pM pro buňky exprimující FAP a s více než stonásobným rozdílem pro buňky bez exprese FAP (Ostermann et al., 2008). DM1 bylo v tomto případě připojeno disulfidovým linkerem s methylovou skupinou vedle disulfidové vazby, kdy substituce kolem disulfidové vazby by mohla mít vliv na její stabilitu (Erickson et al., 2006; Lewis Phillips et al., 2008)

Literatura mimo jiné popisuje množství dalších štěpitelných vazeb mezi toxinem a konjugátem (esterová vazba, hydrazonová vazba, vazba štěpitelná enzymy, vazba aktivovatelná fotolýzou, termolýzou, hypoxickým prostředím (shrnuje Wong and

Choi, 2015), které by se v případě cíleného doručování léčiv daly také uplatnit. Publikace popisující cílení FAP pomocí konjugátů protilátek či jiných prostředků s cytotoxickými molekulami (Huang et al., 2011; Ji et al., 2016; Ostermann et al., 2008), potvrzují, že má smysl vyvíjet terapeutika cílená na FAP a že anti-FAP konjugát by mohl najít mezi nimi své uplatnění.

Výhodou polymerních konjugátů vzhledem ke stále novým vyvíjejícím se prostředkům jak pro cílení, tak pro zobrazování FAP, je jejich univerzálnost a modularita. Polymerní konjugát funguje jako „molekulární lego“, kdy je možné zvolit si, které ligandy (a přibližně také kolik) připojit ke konjugátu. Zároveň umožňuje zvolit si prakticky libovolný fluorofor, a tím optimalizovat použití konjugátu pro jednotlivé přístroje a vhodná experimentální využití (Šácha et al., 2016). Navíc výměnou fluoroforu za zobrazovací ligand jiného typu, jako je například ligand pro pozitronovou emisní tomografii (PET), lze použít konjugát také v diagnostice. V nedávné době byly publikovány studie, které popisují FAP a jeho expresi využitelnou pro detekci a zobrazení nádorů (Lindner et al., 2018) či tkání postižených revmatoidní artritidou (Laverman et al., 2015). Pro tyto účely by se mohl anti-FAP konjugát nesoucí inhibitor a sondu pro PET stát novým nástrojem, s možným příslibem vlastností jako je např. větší citlivost (díky více jednotkám zobrazovacího ligandu na jedné molekule konjugátu). Srovnání takového anti-FAP konjugátu s publikovaným konjugátem nízkomolekulárního inhibitoru s DOTA (Lindner 2018) by bylo na místě, neboť Lindner et al. používali stejně modifikovaný inhibitor, jaký obsahuje námi vytvořený anti-FAP konjugát.

Protože může být konjugát připraven s různým množstvím ligandů, může se tímto způsobem i upravovat molekulová hmotnost celého konjugátu, což má význam z farmakologického hlediska, kdy lze takto modulovat potenciální dobu cirkulace v krvi (Lammers et al., 2005).

7 Závěr

V rámci diplomové práce jsem připravila rekombinantní fibroblastový aktivační protein (FAP) a jeho homolog dipeptidylpeptidasu IV (DPP-IV), a to lidské i myší varianty obou proteinů. Na základě inhibičních schopností navržených inhibitorů FAP byl vybrán nejúčinnější z nich pro vytvoření polymerního konjugátu s inhibitorem FAP, fluoroforem a biotinem (anti-FAP konjugát).

Tento polymerní konjugát jsem následně charakterizovala a otestovala v *in vitro* metodách. Hodnoty inhibičních konstant pro FAP ($IC_{50} = 1,1 \text{ nM}$) a DPP-IV ($IC_{50} > 10 \text{ }\mu\text{M}$) prokázaly selektivitu toho konjugátu vůči DPP-IV a jeho použitelnost i pro cílení myšího FAP ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$).

Polymerní konjugát funguje v *in vitro* metodách jako je imunoprecipitace, ELISA, Western blot a pomocí konfokální mikroskopie a průtokové cytometrie jej lze použít pro visualisaci FAP na živých buňkách.

Na základě pozorování účinné internalizace konjugátu do buněk exprimujících FAP byla vytvořena cytotoxická verze konjugátu s inhibitorem FAP a toxinem DM1. Tento konjugát prokázal cytotoxický účinek na buňky exprimující FAP a existenci poměrně širokého terapeutického okna mezi účinkem na buňky exprimující FAP a neexprimující FAP.

Polymerní konjugát je novým nástrojem pro studium FAP v mnoha *in vitro* metodách, s příslibem jeho budoucího využití také v *in vivo* experimentech pro cílené doručování léčiv.

Část výsledků prezentovaných v této diplomové práci byla publikována v časopise Journal of Medicinal Chemistry (Dvořáková, P., Bušek, P., Knedlík, T., Schimer, J., Etrych, T., Kostka, L., Stollinová Šromová, L., Šubr, V., Šácha, P., Šedo, A., Konvalinka, J. (2017). Inhibitor-Decorated Polymer Conjugates Targeting Fibroblast Activation Protein. J. Med. Chem. 60, 8385–8393).

8 Použitá literatura

- Acharya, P.S., Zukas, A., Chandan, V., Katzenstein, A.-L.A., and Puré, E. (2006). Fibroblast activation protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol.* 37, 352–360.
- Aertgeerts, K., Levin, I., Shi, L., Snell, G.P., Jennings, A., Prasad, G.S., Zhang, Y., Kraus, M.L., Salakian, S., Sridhar, V., et al. (2005). Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. *J. Biol. Chem.* 280, 19441–19444.
- Artym, V.V., Kindzelskii, A.L., Chen, W.-T., and Petty, H.R. (2002). Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton. *Carcinogenesis* 23, 1593–1601.
- Bae, S., Park, C.W., Son, H.K., Ju, H.K., Paik, D., Jeon, C.-J., Koh, G.Y., Kim, J., and Kim, H. (2008). Fibroblast activation protein alpha identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Br. J. Haematol.* 142, 827–830.
- Barinka, C., Ptacek, J., Richter, A., Novakova, Z., Morath, V., and Skerra, A. (2016). Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Protein Eng. Des. Sel.* 29, 105–115.
- Bauer, S., Jendro, M.C., Wadle, A., Kleber, S., Stenner, F., Dinser, R., Reich, A., Faccin, E., Gödde, S., Dinges, H., et al. (2006). Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res. Ther.* 8, R171.
- Binz, H.K., Stumpp, M.T., Forrer, P., Amstutz, P., and Plückthun, A. (2003). Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 332, 489–503.
- Brokopp, C.E., Schoenauer, R., Richards, P., Bauer, S., Lohmann, C., Emmert, M.Y., Weber, B., Winnik, S., Aikawa, E., Graves, K., et al. (2011). Fibroblast activation protein is induced by inflammation and degrades type I collagen in thin-cap fibroatheromata. *Eur. Heart J.* 32, 2713–2722.
- Busek, P., Hrabal, P., Fric, P., and Sedo, A. (2015). Co-expression of the homologous proteases fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase-IV in the adult human Langerhans islets. *Histochem. Cell Biol.* 143, 497–504.
- Busek, P., Balaziová, E., Matrasová, I., Hilser, M., Tomas, R., Syrucek, M., Zemanová, Z., Krepela, E., Belacek, J., and Sedo, A. (2016). Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biol.* 37, 13961–13971.
- Chari, R.V., Martell, B.A., Gross, J.L., Cook, S.B., Shah, S.A., Blättler, W.A., McKenzie, S.J., and Goldmacher, V.S. (1992). Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Res.* 52, 127–131.

- Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., Hu, G., and Sun, Y. (2015). New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med* 13, 45.
- Chung, K.-M., Cheng, J.-H., Suen, C.-S., Huang, C.-H., Tsai, C.-H., Huang, L.-H., Chen, Y.-R., Wang, A.H.-J., Jiaang, W.-T., Hwang, M.-J., et al. (2010). The dimeric transmembrane domain of prolyl dipeptidase DPP-IV contributes to its quaternary structure and enzymatic activities. *Protein Sci* 19, 1627–1638.
- Correa, A., Pacheco, S., Mechaly, A.E., Obal, G., Béhar, G., Mouratou, B., Oppezzo, P., Alzari, P.M., and Pecorari, F. (2014). Potent and Specific Inhibition of Glycosidases by Small Artificial Binding Proteins (Affitins). *PLoS One* 9.
- Cox, J.C., Hayhurst, A., Hesselberth, J., Bayer, T.S., Georgiou, G., and Ellington, A.D. (2002). Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res* 30, e108.
- Dinjens, W.N., ten Kate, J., van der Linden, E.P., Wijnen, J.T., Khan, P.M., and Bosman, F.T. (1989). Distribution of adenosine deaminase complexing protein (ADCP) in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1869–1875.
- Dolznic, H., Schweifer, N., Puri, C., Kraut, N., Rettig, W.J., Kerjaschki, D., and Garin-Chesa, P. (2005). Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun.* 5, 10.
- Dunshee, D.R., Bainbridge, T.W., Kljavin, N.M., Zavala-Solorio, J., Schroeder, A.C., Chan, R., Corpuz, R., Wong, M., Zhou, W., Deshmukh, G., et al. (2016). Fibroblast Activation Protein Cleaves and Inactivates Fibroblast Growth Factor 21. *J. Biol. Chem.* 291, 5986–5996.
- Duperret, E.K., Trautz, A., Ammons, D., Perales-Puchalt, A., Wise, M.C., Yan, J., Reed, C., and Weiner, D.B. (2018). Alteration of the Tumor Stroma Using a Consensus DNA Vaccine Targeting Fibroblast Activation Protein (FAP) Synergizes with Antitumor Vaccine Therapy in Mice. *Clin. Cancer Res.* 24, 1190–1201.
- Dvořáková, P., Bušek, P., Knedlík, T., Schimer, J., Etrych, T., Kostka, L., Stollinová Šromová, L., Šubr, V., Šácha, P., Šedo, A., Konvalinka, J. (2017). Inhibitor-Decorated Polymer Conjugates Targeting Fibroblast Activation Protein. *J. Med. Chem.* 60, 8385–8393.
- Eager, R.M., Cunningham, C.C., Senzer, N., Richards, D.A., Raju, R.N., Jones, B., Uprichard, M., and Nemunaitis, J. (2009). Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 21, 464–472.
- Edosada, C.Y., Quan, C., Wiesmann, C., Tran, T., Sutherlin, D., Reynolds, M., Elliott, J.M., Raab, H., Fairbrother, W., and Wolf, B.B. (2006a). Selective inhibition of fibroblast activation protein protease based on dipeptide substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 281, 7437–7444.

Edosada, C.Y., Quan, C., Tran, T., Pham, V., Wiesmann, C., Fairbrother, W., and Wolf, B.B. (2006b). Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict Gly(2)-Pro(1)-cleaving specificity. *FEBS Lett.* *580*, 1581–1586.

Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* *346*, 818–822.

Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H.-U., and Brandstetter, H. (2003). The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 5063–5068.

Erickson, H.K., Park, P.U., Widdison, W.C., Kovtun, Y.V., Garrett, L.M., Hoffman, K., Lutz, R.J., Goldmacher, V.S., and Blättler, W.A. (2006). Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res.* *66*, 4426–4433.

Fan, M.-H., Zhu, Q., Li, H.-H., Ra, H.-J., Majumdar, S., Gulick, D.L., Jerome, J.A., Madsen, D.H., Christofidou-Solomidou, M., Speicher, D.W., et al. (2016). Fibroblast Activation Protein (FAP) Accelerates Collagen Degradation and Clearance from Lungs in Mice. *J. Biol. Chem.* *291*, 8070–8089.

Fiedler, U., Ekawardhani, S., Cornelius, A., Gilboy, P., Bakker, T.R., Dolado, I., Stumpp, M.T., and Dawson, K.M. (2017). MP0250, a VEGF and HGF neutralizing DARPIn® molecule shows high anti-tumor efficacy in mouse xenograft and patient-derived tumor models. *Oncotarget* *8*, 98371–98383.

Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1990). Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 7235–7239.

Ge, Y., Zhan, F., Barlogie, B., Epstein, J., Shaughnessy, J., and Yaccoby, S. (2006). Fibroblast activation protein (FAP) is upregulated in myelomatous bone and supports myeloma cell survival. *Br. J. Haematol.* *133*, 83–92.

Goldstein, L.A., Gherzi, G., Piñeiro-Sánchez, M.L., Salamone, M., Yeh, Y., Flessate, D., and Chen, W.T. (1997). Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochim. Biophys. Acta* *1361*, 11–19.

Gorrell, M.D., Gysbers, V., and McCaughan, G.W. (2001). CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* *54*, 249–264.

Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 5547–5551.

Guan, X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B* *5*, 402–418.

Hegnerova, K., Bockova, M., Vaisocherova, H., Kristofikova, Z., Ricny, J., Ripova, D., and Homola, J. (2010). Surface plasmon resonance biosensors for detection of Alzheimer disease biomarker. *Sens. Actuators, B* *139*, 69–73.

- Herter, S., Morra, L., Schlenker, R., Sulcova, J., Fahrni, L., Waldhauer, I., Lehmann, S., Reisländer, T., Agarkova, I., Kelm, J.M., et al. (2017). A novel three-dimensional heterotypic spheroid model for the assessment of the activity of cancer immunotherapy agents. *Cancer Immunol Immunother* 66, 129–140.
- Hofheinz, R.-D., al-Batran, S.-E., Hartmann, F., Hartung, G., Jäger, D., Renner, C., Tanswell, P., Kunz, U., Amelsberg, A., Kuthan, H., et al. (2003). Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie* 26, 44–48.
- Huang, S., Fang, R., Xu, J., Qiu, S., Zhang, H., Du, J., and Cai, S. (2011). Evaluation of the tumor targeting of a FAP α -based doxorubicin prodrug. *J Drug Target* 19, 487–496.
- Hutchinson, J.W., Tierney, G.M., Parsons, S.L., and Davis, T.R. (1998). Dupuytren's disease and frozen shoulder induced by treatment with a matrix metalloproteinase inhibitor. *J Bone Joint Surg Br* 80, 907–908.
- Irons, B.K., Weis, J.M., Stapleton, M.R., and Edwards, K.L. (2012). An update in incretin-based therapy: a focus on dipeptidyl peptidase--4 inhibitors. *Curr Diabetes Rev* 8, 169–182.
- Iwasa, S., Jin, X., Okada, K., Mitsumata, M., and Ooi, A. (2003). Increased expression of seprase, a membrane-type serine protease, is associated with lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Lett.* 199, 91–98.
- Jambunathan, K., Watson, D.S., Endsley, A.N., Kodukula, K., and Galande, A.K. (2012). Comparative analysis of the substrate preferences of two post-proline cleaving endopeptidases, prolyl oligopeptidase and fibroblast activation protein α . *FEBS Lett.* 586, 2507–2512.
- Jansen, K., Heirbaut, L., Cheng, J.D., Joossens, J., Ryabtsova, O., Cos, P., Maes, L., Lambeir, A.-M., De Meester, I., Augustyns, K., et al. (2013). Selective Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine Scaffold. *ACS Med Chem Lett* 4, 491–496.
- Jansen, K., Heirbaut, L., Verkerk, R., Cheng, J.D., Joossens, J., Cos, P., Maes, L., Lambeir, A.-M., De Meester, I., Augustyns, K., et al. (2014). Extended structure-activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl)glycyl-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein (FAP). *J. Med. Chem.* 57, 3053–3074.
- Ji, T., Zhao, Y., Ding, Y., Wang, J., Zhao, R., Lang, J., Qin, H., Liu, X., Shi, J., Tao, N., et al. (2016). Transformable Peptide Nanocarriers for Expeditious Drug Release and Effective Cancer Therapy via Cancer-Associated Fibroblast Activation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55, 1050–1055.
- Jin, X., Iwasa, S., Okada, K., Mitsumata, M., and Ooi, A. (2003). Expression patterns of seprase, a membrane serine protease, in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplasm. *Anticancer Res.* 23, 3195–3198.

- Kajiyama, H., Kikkawa, F., Suzuki, T., Shibata, K., Ino, K., and Mizutani, S. (2002). Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 62, 2753–2757.
- Keane, F.M., Nadvi, N.A., Yao, T.-W., and Gorrell, M.D. (2011). Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein- α . *FEBS J.* 278, 1316–1332.
- Keane, F.M., Yao, T.-W., Seelk, S., Gall, M.G., Chowdhury, S., Poplawski, S.E., Lai, J.H., Li, Y., Wu, W., Farrell, P., et al. (2013). Quantitation of fibroblast activation protein (FAP)-specific protease activity in mouse, baboon and human fluids and organs. *FEBS Open Bio* 4, 43–54.
- Kelly, T., Kechelava, S., Rozypal, T.L., West, K.W., and Korourian, S. (1998). Seprase, a membrane-bound protease, is overexpressed by invasive ductal carcinoma cells of human breast cancers. *Mod. Pathol.* 11, 855–863.
- Kopeček, J., and Bažilová, H. (1973). Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]—I. Radical polymerization and copolymerization. *European Polymer Journal* 9, 7–14.
- Lammers, T., Kühnlein, R., Kissel, M., Subr, V., Etrych, T., Pola, R., Pechar, M., Ulbrich, K., Storm, G., Huber, P., et al. (2005). Effect of physicochemical modification on the biodistribution and tumor accumulation of HPMa copolymers. *J Control Release* 110, 103–118.
- Laverman, P., van der Geest, T., Terry, S.Y.A., Gerrits, D., Walgreen, B., Helsen, M.M., Nayak, T.K., Freimoser-Grundschober, A., Waldhauer, I., Hosse, R.J., et al. (2015). Immuno-PET and Immuno-SPECT of Rheumatoid Arthritis with Radiolabeled Anti-Fibroblast Activation Protein Antibody Correlates with Severity of Arthritis. *Journal of Nuclear Medicine* 56, 778–783.
- Lee, K.N., Jackson, K.W., Christiansen, V.J., Chung, K.H., and McKee, P.A. (2004). A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood* 103, 3783–3788.
- Lee, K.N., Jackson, K.W., Christiansen, V.J., Lee, C.S., Chun, J.-G., and McKee, P.A. (2006). Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 107, 1397–1404.
- Levy, M.T., McCaughan, G.W., Abbott, C.A., Park, J.E., Cunningham, A.M., Müller, E., Rettig, W.J., and Gorrell, M.D. (1999). Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* 29, 1768–1778.
- Lewis Phillips, G.D., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blättler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V.J., Lutz, R.J., et al. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* 68, 9280–9290.
- Lindner, T., Loktev, A., Altmann, A., Giesel, F., Kratochwil, C., Debus, J., Jäger, D., Mier, W., and Haberkorn, U. (2018). Development of quinoline based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein. *J. Nucl. Med.*

- Loeffler, M., Krüger, J.A., Niethammer, A.G., and Reisfeld, R.A. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest* 116, 1955–1962.
- López-Otín, C., and Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 283, 30433–30437.
- Marguet, D., Baggio, L., Kobayashi, T., Bernard, A.M., Pierres, M., Nielsen, P.F., Ribel, U., Watanabe, T., Drucker, D.J., and Wagtmann, N. (2000). Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6874–6879.
- Matsumura, Y., and Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46, 6387–6392.
- Mesters, J.R., Barinka, C., Li, W., Tsukamoto, T., Majer, P., Slusher, B.S., Konvalinka, J., and Hilgenfeld, R. (2006). Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *EMBO J* 25, 1375–1384.
- Milowsky, M.I., Galsky, M.D., Morris, M.J., Crona, D.J., George, D.J., Dreicer, R., Tse, K., Petruck, J., Webb, I.J., Bander, N.H., et al. (2016). Phase 1/2 multiple ascending dose trial of the prostate-specific membrane antigen-targeted antibody drug conjugate MLN2704 in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Urol. Oncol.* 34, 530.e15-530.e21.
- Moyers, J.S., Shiyanova, T.L., Mehrbod, F., Dunbar, J.D., Noblitt, T.W., Otto, K.A., Reifel-Miller, A., and Kharitonov, A. (2007). Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *J. Cell. Physiol.* 210, 1–6.
- Narra, K., Mullins, S.R., Lee, H.-O., Strzemkowski-Brun, B., Magalong, K., Christiansen, V.J., McKee, P.A., Egleston, B., Cohen, S.J., Weiner, L.M., et al. (2007). Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1691–1699.
- Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohm, J., Ulbrich, K., Akaike, T., and Maeda, H. (1998). Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 307–314.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Ståhl, S., Uhlén, M., and Nygren, P.A. (1997). Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat. Biotechnol.* 15, 772–777.
- Ohnuma, K., Dang, N.H., and Morimoto, C. (2008). Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol.* 29, 295–301.
- Okamoto, T., Iwata, S., Yamazaki, H., Hatano, R., Komiya, E., Dang, N.H., Ohnuma, K., and Morimoto, C. (2014). CD9 negatively regulates CD26 expression and inhibits CD26-mediated enhancement of invasive potential of malignant mesothelioma cells. *PLoS ONE* 9, e86671.

- Ostermann, E., Garin-Chesa, P., Heider, K.H., Kalat, M., Lamche, H., Puri, C., Kerjaschki, D., Rettig, W.J., and Adolf, G.R. (2008). Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts. *Clin. Cancer Res.* *14*, 4584–4592.
- Pang, R., Law, W.L., Chu, A.C.Y., Poon, J.T., Lam, C.S.C., Chow, A.K.M., Ng, L., Cheung, L.W.H., Lan, X.R., Lan, H.Y., et al. (2010). A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* *6*, 603–615.
- Park, J.E., Lenter, M.C., Zimmermann, R.N., Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *274*, 36505–36512.
- Pimková, K., Bocková, M., Hegnerová, K., Suttner, J., Cermák, J., Homola, J., and Dyr, J.E. (2012). Surface plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1--a protein marker of myelodysplastic syndromes. *Anal Bioanal Chem* *402*, 381–387.
- Piñeiro-Sánchez, M.L., Goldstein, L.A., Dodt, J., Howard, L., Yeh, Y., Tran, H., Argraves, W.S., and Chen, W.T. (1997). Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J. Biol. Chem.* *272*, 7595–7601.
- Poplawski, S.E., Lai, J.H., Li, Y., Jin, Z., Liu, Y., Wu, W., Wu, Y., Zhou, Y., Sudmeier, J.L., Sanford, D.G., et al. (2013). Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase. *J. Med. Chem.* *56*, 3467–3477.
- Ramirez-Montagut, T., Blachere, N.E., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Rettig, W.J., Garin-Chesa, P., and Houghton, A.N. (2004). FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene* *23*, 5435–5446.
- Remillard, S., Rebhun, L.I., Howie, G.A., and Kupchan, S.M. (1975). Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science* *189*, 1002–1005.
- Rüger, R., Tansi, F.L., Rabenhold, M., Steiniger, F., Kontermann, R.E., Fahr, A., and Hilger, I. (2014). In vivo near-infrared fluorescence imaging of FAP-expressing tumors with activatable FAP-targeted, single-chain Fv-immunoliposomes. *Journal of Controlled Release* *186*, 1–10.
- Šácha, P., Knedlík, T., Schimer, J., Tykvart, J., Parolek, J., Navrátil, V., Dvořáková, P., Sedlák, F., Ulbrich, K., Strohalm, J., Majer, P., Šubr, V., Konvalinka, J. (2016). iBodies: Modular Synthetic Antibody Mimetics Based on Hydrophilic Polymers Decorated with Functional Moieties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *55*, 2356–2360.
- Sánchez-Garrido, M.A., Habegger, K.M., Clemmensen, C., Holleman, C., Müller, T.D., Perez-Tilve, D., Li, P., Agrawal, A.S., Finan, B., Drucker, D.J., et al. (2016). Fibroblast activation protein (FAP) as a novel metabolic target. *Molecular Metabolism* *5*, 1015–1024.
- Santos, A.M., Jung, J., Aziz, N., Kissil, J.L., and Puré, E. (2009). Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3613–3625.

Sevenich, L., and Joyce, J.A. (2014). Pericellular proteolysis in cancer. *Genes Dev.* 28, 2331–2347.

Seymour, L.W., Ferry, D.R., Kerr, D.J., Rea, D., Whitlock, M., Poyner, R., Boivin, C., Hesslewood, S., Twelves, C., Blackie, R., et al. (2009). Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 34, 1629–1636.

Shi, M., Yu, D.-H., Chen, Y., Zhao, C.-Y., Zhang, J., Liu, Q.-H., Ni, C.-R., and Zhu, M.-H. (2012). Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 18, 840–846.

Siegler, E.L., Kim, Y.J., and Wang, P. (2016). Nanomedicine targeting the tumor microenvironment: Therapeutic strategies to inhibit angiogenesis, remodel matrix, and modulate immune responses. *Journal of Cellular Immunotherapy* 2, 69–78.

Silverman, J., Liu, Q., Lu, Q., Bakker, A., To, W., Duguay, A., Alba, B.M., Smith, R., Rivas, A., Li, P., et al. (2005). Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1556–1561.

Sprincl, L., Kopecek, J., Vacík, J., and Lím, D. (1971). Biological tolerance of poly(N-substituted methacrylamides). *J. Biomed. Mater. Res.* 5, 197–205.

Šubr, V., and Ulbrich, K. (2006). Synthesis and properties of new N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers containing thiazolidine-2-thione reactive groups. *Reactive and Functional Polymers* 66, 1525–1538.

Sun, Y.-X., Pedersen, E.A., Shiozawa, Y., Havens, A.M., Jung, Y., Wang, J., Pienta, K.J., and Taichman, R.S. (2008). CD26/dipeptidyl peptidase IV regulates prostate cancer metastasis by degrading SDF-1/CXCL12. *Clin. Exp. Metastasis* 25, 765–776.

Tillmanns, J., Hoffmann, D., Habbaba, Y., Schmitto, J.D., Sedding, D., Fraccarollo, D., Galuppo, P., and Bauersachs, J. (2015). Fibroblast activation protein alpha expression identifies activated fibroblasts after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 87, 194–203.

Tykvar, J., Sácha, P., Bařinka, C., Knedlík, T., Starková, J., Lubkowski, J., and Konvalinka, J. (2012). Efficient and versatile one-step affinity purification of in vivo biotinylated proteins: expression, characterization and structure analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II. *Protein Expr. Purif.* 82, 106–115.

Uitte de Willige, S., Keane, F.M., Bowen, D.G., Malfliet, J.J.M.C., Zhang, H.E., Maneck, B., McCaughan, G.W., Leebeek, F.W.G., Rijken, D.C., and Gorrell, M.D. (2017). Circulating fibroblast activation protein activity and antigen levels correlate strongly when measured in liver disease and coronary heart disease. *PLoS One* 12.

Van, S., Das, S.K., Wang, X., Feng, Z., Jin, Y., Hou, Z., Chen, F., Pham, A., Jiang, N., Howell, S.B., et al. (2010). Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly(L-γ-glutamyl-glutamine)- paclitaxel nanoconjugate. *Int J Nanomedicine* 5, 825–837.

- Vandooren, J., Opdenakker, G., Loadman, P.M., and Edwards, D.R. (2016). Proteases in cancer drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 144–155.
- Vasey, P.A., Kaye, S.B., Morrison, R., Twelves, C., Wilson, P., Duncan, R., Thomson, A.H., Murray, L.S., Hilditch, T.E., Murray, T., et al. (1999). Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee. *Clin. Cancer Res.* 5, 83–94.
- Velaei, K., Samadi, N., Barazvan, B., and Soleimani Rad, J. (2016). Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *Breast* 30, 92–100.
- Wang, H., Wu, Q., Liu, Z., Luo, X., Fan, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Hua, S., Fu, Q., Zhao, M., et al. (2014). Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis* 5, e1155.
- Wang, R.-F., Zhang, L.-H., Shan, L.-H., Sun, W.-G., Chai, C.-C., Wu, H.-M., Ibla, J.C., Wang, L.-F., and Liu, J.-R. (2013). Effects of the fibroblast activation protein on the invasion and migration of gastric cancer. *Exp. Mol. Pathol.*
- Willige, S.U. de, Malfliet, J.J.M.C., Janssen, H.L.A., Leebeek, F.W.G., and Rijken, D.C. (2013). Increased N-terminal cleavage of alpha-2-antiplasmin in patients with liver cirrhosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11, 2029–2036.
- Wiman, B., and Collen, D. (1979). On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin. *J. Biol. Chem.* 254, 9291–9297.
- Wong, P.T., and Choi, S.K. (2015). Mechanisms of drug release in nanotherapeutic delivery systems. *Chem. Rev.* 115, 3388–3432.
- Wong, P.F., Gall, M.G., Bachovchin, W.W., McCaughan, G.W., Keane, F.M., and Gorrell, M.D. (2016). Neuropeptide Y is a physiological substrate of fibroblast activation protein: Enzyme kinetics in blood plasma and expression of Y2R and Y5R in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Peptides* 75, 80–95.
- Yang, L., Ma, L., and Lai, D. (2013). Over-expression of fibroblast activation protein alpha increases tumor growth in xenografts of ovarian cancer cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 45, 928–937.
- Yang, X., Lin, Y., Shi, Y., Li, B., Liu, W., Yin, W., Dang, Y., Chu, Y., Fan, J., and He, R. (2016). FAP Promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling. *Cancer Res.* 76, 4124–4135.
- Yu, X., Yang, Y.-P., Dikici, E., Deo, S.K., and Daunert, S. (2017). Beyond Antibodies as Binding Partners: The Role of Antibody Mimetics in Bioanalysis. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 10, 293–320.
- Zhen, E.Y., Jin, Z., Ackermann, B.L., Thomas, M.K., and Gutierrez, J.A. (2016). Circulating FGF21 proteolytic processing mediated by fibroblast activation protein. *Biochem. J.* 473, 605–614.

Webové zdroje:

ClinicalTrials [cit. 2018-4-10] – www.clinicaltrials.gov, identifikátor studie: NCT02627274

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02627274?term=NCT02627274&rank=1>

ClinicalTrials [cit. 2018-4-10] – www.clinicaltrials.gov, identifikátor studie: NCT03063762

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03063762?term=NCT03063762&rank=1>